



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NA HIPERPLASIA QUÍSTICA DO
ENDOMÉTRIO EM CADELAS

ANA CATARINA MATEUS MURTA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutora Maria da Conceição Peleteiro

Vogais:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire

Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel

de Jesus Correia

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NA HIPERPLASIA QUÍSTICA DO
ENDOMÉTRIO EM CADELAS

ANA CATARINA MATEUS MURTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutora Maria da Conceição Peleteiro

Vogais:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire

Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel

de Jesus Correia

2013

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Luísa Mateus, a minha orientadora, pela enorme paciência que demonstrou estes longos anos em que decorreu este processo, por nunca ter desistido de me orientar e me explicar com infinita paciência, os “meandros” da Hiperplasia Quística. Por toda a dedicação, e pelo empenho que demonstra diariamente na sua área, terá sempre a minha eterna admiração e gratidão.

Ao Professor Doutor Jorge Correia, também por se ter mantido do meu lado, perguntando-me ocasionalmente, com um misto de simpatia e complacência, como estava andar o trabalho, incentivando-me. Por ter aceite ser meu co-orientador e ter demonstrado uma paciência ainda maior quando lhe dei a tese para corrigir em cima da hora. O meu sentido obrigado.

À Sílvia Cruz, pela ajuda preciosa na recolha e processamento dos úteros, pelo estudo realizado em úteros sem HQE, no qual baseei o meu estudo comparativo, pela cedência de material de consulta e fotográfico. Pela sua enorme contribuição para este estudo, pelo seu apoio e simpatia. Desejo-lhe muita sorte na sua carreira profissional, que bem a merece, pois sei que será uma veterinária extremamente dedicada.

A todo o pessoal do Departamento de Reprodução e Obstetrícia, pelo processamento do material e ter possibilitado o meu estudo e esta dissertação. Pela sua contribuição permanente para a descoberta dos mecanismos que desencadeiam esta doença.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) por continuar a apoiar este projeto.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Patológica, especialmente à Professora Doutora Conceição Peleteiro, por ter permitido a realização de alguns processos fundamentais ao desenvolvimento deste estudo. À D^a Maria do Rosário Luís e Sandra Carvalho, técnicas deste laboratório pela ajuda preciosa neste mesmo processo. Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, pela realização das análises bacteriológicas dos úteros em estudo.

Aos meus pais, pela eterna paciência e acompanhamento nesta minha busca incessante por novas experiências, crescimento pessoal e profissional. Por me terem apoiado sempre. Por terem sempre feito de tudo para me darem o melhor que puderam e a melhor educação possível. Grande parte do que sou devo-o a eles.

À minha irmã, por me ter de aturar, pelas nossas eternas “brigas” e pelo seu incansável espírito galináceo. Por achar que eu serei sempre uma criança e que me têm de orientar e alimentar! Pela dedicação ao meu sobrinho, que se está a fazer um homenzinho! O tempo realmente passa depressa!

Às minhas “gaijas” (vocês sabem quem são!), pela partilha de vida, experiências e uma amizade incondicional que vai durar até ao fim dos dias. Pela nossa “roda-dentada”! Aos meus “gajos” também, pela apoio de sempre e para sempre. Pelos anos que me aturaram, nas mais diversas situações. Por estarem sempre presentes quando preciso. Por partilharem as vossas vidas comigo, com quem podem contar para sempre.

A todos os outros amigos, velhos e novos, aos que me conheceram recentemente mas com quem espero poder partilhar esta vida durante muito tempo. A todos os meus colegas de trabalho por me aturarem diariamente, por lutarmos todos por um ideal, ainda que por vezes em condições extremas. Aos enfermeiros, auxiliares, estagiários e todos os restantes elementos que fazem o Hospital Escolar andar para a frente.

Ao Paulo, por ter acompanhado este longo processo, pela paciência, pelos sacrifícios feitos durante este estudo, por todas as experiências vividas juntos, inesquecíveis!

Um agradecimento especial à minha “estagiária” Ana Afonso, pela sua ajuda preciosa na finalização desta tese, pela motivação que me deu para continuar esta saga, pela companhia na realização da escrita. Por todas as horas passadas na Cirurgia, pelo seu talento anestésico. Pela grande amizade que se formou e que sei que se manterá para a vida.

À minha gata Pipas, pela companhia de todas as horas, por estar sempre onde eu estiver, por me seguir pelo mundo. Por fazer parte do meu mundo. Para sempre.

RESUMO

APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NA HIPERPLASIA QUÍSTICA DO ENDOMÉTRIO EM CADELAS

A hiperplasia quística do endométrio (HQE) é a afecção mais frequente do útero, estando associada a infertilidade em cadelas de idade mais avançada. Apesar do mecanismo que leva a esta alteração ainda não ser claro, pensa-se que a estimulação estrogénica seguida por um longo período de dominância progestagénica possa estar envolvida. O objectivo deste estudo foi avaliar os índices de apoptose e proliferação celular em úteros com HQE, e compará-los com os mesmos índices obtidos em úteros sem HQE, na mesma fase do ciclo. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da presença de quistos ováricos nos índices de proliferação e apoptose do endométrio.

No estudo realizado verificamos que a apoptose foi superior nas glândulas basais na fase de Estro e fim de Diestro na HQE e inferior no epitélio luminal em fim de Diestro com associação de quisto folicular na HQE em relação ao útero sem HQE. A proliferação celular foi superior nas glândulas basais e estroma e inferior no epitélio luminal no fim de Diestro nos úteros com HQE em relação aos sem HQE. Observaram-se igualmente aumentos na proliferação entre úteros sem HQE de cadelas com quistos ováricos, nas células das criptas e no estroma no início e meio de Diestro, respectivamente e diminuição da proliferação nas glândulas basais no início de diestro. Verificou-se adicionalmente o aparecimento de “ilhas glandulares”, com diminuição do índice de apoptose, que hipoteticamente poderão participar na génese da HQE.

O presente estudo mostrou que alterações nos padrões normais de proliferação e de apoptose celular no endométrio da cadela poderão estar envolvidos na patogenia da hiperplasia quística do endométrio.

Palavras-chaves: Hiperplasia quística; Endométrio; Cadela; Apoptose; Proliferação celular

ABSTRACT

APOPTOSIS AND CELLULAR PROLIFERATION IN THE CYSTIC ENDOMETRIAL HYPERPLASIA OF THE BITCH

Cystic endometrial hyperplasia (CEH) is the most frequent disease of the uterus, usually associated with infertility in older bitches. Although the mechanism that leads to this disease is not entirely clear, it is thought that an estrogenic stimulation followed by a long period of progestagenic dominance may be involved.

The aim of this study was to evaluate the indexes of apoptosis and cellular proliferation in uterus with CEH and compare them with the respective indexes in uterus without CEH, in the same stage of the estrous cycle. Additionally, it was evaluated the effect of the ovarian cysts in the indexes of endometrial apoptosis and cellular proliferation.

The study revealed that the apoptosis indexes increased in the basal glands in oestrus and late diestrus and decreased in the luminal epithelium in late diestrus in HQE compared with uterus without HQE. The cellular proliferation increased in the basal glands and stromal cells and decreased in the luminal epithelium in late diestrus in uterus with HQE. An increase in proliferation was also observed between uterus with ovarian cysts, in the crypts for early diestrus and stromal cells in mid diestrus. The proliferation decreased significantly in the basal glands in early diestrus. Additionally, we confirmed the presence of “glandular islands”, groups of basal glands proliferating when they should be in involution, with evidently decreased apoptosis indexes. This event may hypothetically participate in the genesis of HQE.

The present study reveals that the alteration in the apoptosis and cellular proliferation standard patterns in the bitch endometrium may be involved in the pathogenesis of the cystic endometrial hyperplasia.

Keywords: Cystic hyperplasia; Endometrium; Bitch; Apoptosis; Cellular proliferation

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.	Aspectos da fisiologia ovárica e uterina	2
1.1.	Ciclo éstrico.....	3
1.1.1.	Proestro.....	3
1.1.2.	Estro.....	4
1.1.3.	Diestro.....	5
1.1.4.	Anestro.....	6
1.2.	Alterações histológicas do útero durante o ciclo éstrico	8
2.	Apoptose	11
2.1.	Mecanismos apoptóticos- morte celular programada	12
2.1.1.	Via extrínseca	12
2.1.2.	Via intrínseca	13
2.2.	Apoptose no endométrio canino durante o ciclo éstrico.....	15
2.3.	Apoptose no endométrio da mulher durante o ciclo éstrico	16
3.	Hiperplasia quística do endométrio (HQE)	17
3.1.	Classificação	17
3.2.	Prevalência.....	23
3.3.	Etiologia.....	24
3.3.1.	Alterações das concentrações de progesterona e estrogénios	24
3.3.2.	Influência de irritantes uterinos	25
3.3.3.	Infecção bacteriana.....	26
3.3.4.	Receptores de progesterona e estrogénio.....	27
3.3.5.	Factores de crescimento.....	28
3.4.	Diagnóstico.....	32
3.5.	Tratamento.....	35
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
1.	Amostragem	38
1.1.	Colheita de Amostras	38
1.2.	Caracterização das amostras.....	39
2.	Marcação por imunohistoquímica do Ki-67	39
3.	TUNEL.....	40
4.	Análise quantitativa	41
5.	Análise estatística.....	42
IV.	RESULTADOS.....	43
1.	Avaliação histológica dos úteros	43
2.	Avaliação do índice de proliferação celular por Ki67.....	45
3.	Avaliação do índice de apoptose celular por TUNEL	48
4.	“Ilhas glandulares”	50
5.	Progesterona	51
6.	Zaragatoas intra-uterinas	51
V.	DISCUSSÃO	52
VI.	CONCLUSÃO	58
VII.	BIBLIOGRAFIA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das alterações observadas nas concentrações hormonais durante as diferentes fases do ciclo éstrico da cadela.	7
Figura 2 - Cortes histológicos do útero durante o proestro (coloração H&E).....	9
Figura 3 - Cortes histológicos do útero durante o estro (coloração H&E).....	9
Figura 4 - Cortes histológicos do útero durante o diestro (coloração H&E).....	10
Figura 5 - Cortes histológicos do útero durante o anestro (coloração H&E).....	10
Figura 6 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose	14
Figura 7 - Aspecto macroscópico de útero com HQE	17
Figura 8 - Corte histológico de útero com HQE de grau I (coloração H&E).....	18
Figura 9 - Corte histológico de útero com HQE de grau II (coloração H&E).....	18
Figura 10 - Corte histológico de útero com HQE de grau IV (coloração tricrômica de Masson)	19
Figura 11 - Aspecto macroscópico de quistos ováricos, numa cadela sem sintomatologia clínica evidente.	21
Figura 12 - Aspecto macroscópico de útero com mucometra e hiperplasia quística ligeira, associada a quistos ováricos bilaterais	23
Figura 13 -Ecogramas de útero com piómetra numa cadela	34
Figura 14 - Imagem radiográfica de piómetra numa cadela.....	35
Figura 15 - Cortes histológicos de útero em diestro com hiperplasia quística do endométrio de estadio I - Coloração H&E.....	44
Figura 16 - Cortes histológicos de útero em diestro com hiperplasia quística do endométrio de estadio II - Coloração H&E.....	45
Figura 17 - Cortes histológicos de útero com hiperplasia quística do endométrio de estadio I- Marcação com Ki67.....	46
Figura 18 - Cortes histológicos de útero com hiperplasia quística do endométrio estadio II- Marcação com Ki67.....	46
Figura 19 - Corte histológico de útero com hiperplasia quística do endométrio estadio I- Marcação com TUNEL	48
Figura 20 - Cortes histológicos de útero com hiperplasia quística do endométrio de estadio II- Marcação com TUNEL	49
Figura 21 - Cortes histológicos de útero de cadela no meio de diestro com "ilhas glandulares" - Coloração H&E, marcação com TUNEL e Ki67	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de progesterona e estrogénio durante o ciclo éstrico (adaptado de Feldman e Nelson, 2004; Concannon 2011)	7
Tabela 2 - Citologia vaginal do ciclo éstrico da cadela (adaptado de Feldman e Nelson, 2004)	8
Tabela 3 - Diferenças morfológicas e funcionais entra a apoptose e a necrose celulares (adaptado de Allen et al., 1997; McConkey, 1998)	11
Tabela 4 - Classificação de Dow dos estadios de hiperplasia quística do endométrio em cadelas (adaptado de Bigliardi, 2004 e Payan Carreira & Pires, 2005)	20
Tabela 5 - Classificação histomorfológica de HQE de De Bosschere (adaptado de Bigliardi, 2004)	23
Tabela 6 - Avaliação da amostra de acordo com a fase do ciclo e estadio de HQE	44
Tabela 7 - Índices de proliferação celular de úteros normais e úteros com HQE, nos diferentes tipos celulares do endométrio, nas fases de estro, início, meio e fim de diestro (média e desvio padrão).	47
Tabela 8 - Índices de apoptose de úteros normais e úteros com HQE, nos diferentes tipos celulares do endométrio, nas fases de estro, início, meio e fim de diestro (média e desvio padrão).	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição da incidência de HQE segundo as raças das cadelas incluídas no estudo	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentagem
µg – Microgramas
µl – Microlitros
µm – Micrómetros
pg- Picogramas
ADN- Ácido desoxirribonucleico
AIF - *Apoptosis-Inducing Factor*
ALP- Fosfatase alcalina
ALT- Alanina transaminase
APAF-1 - *Apoptosis proteases activating factor - 1*
ARN- Ácido ribonucleico
ATP – *Adenosina Trifosfato*
BAX- Bcl-2 associated X protein
Bcl-2- B-cell lymphoma -2
Bid- Bcl interacting domain
BSA – *Bovine serum albumin*
Caspase-CysteinyI aspartate-specific protease
CEH- Cystic endometrial hyperplasia
CIISA – Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal
CNF- Factor de necrose citotóxico
COX2- Cicloxygenase 2
DNAase- Desoxirribonuclease
DD – *Deaht Domain*
DED – *Death Efector Domain*.
DIABLO- Direct IAP binding protein with low pl
DISC- Death inducing signaling complex
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*
DR – *Death Receptor*
E. coli- *Escherichia coli*
EGF – *Epidermal Growth Factor*
EGF-R- *Epidermal Growth Factor receptor*
EHS – *Engelbreth-Holm-Swarm*
EUA – Estados Unidos da América
FADD – *Fas-Associated Death Domain*
FasL – Fas ligante
FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
FSH – Hormona folículo-estimulante
g - Grama
GH- Hormona de crescimento
GHRH- Hormona libertadora da hormona de crescimento
GnRH- Hormona libertadora de gonadotrofina
h – Hora(s)
H&E – Coloração Hematoxilina-Eosina
HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*
HCH- Gonadotrofina coriônica humana
HEFMV – Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária
HQE – Hiperplasia Quística do Endométrio

IAP - *Inhibitor of Apoptosis Protein*
 IgF – Imunoglobulina F
 IGF1 – *Insulin Growth Factor 1*
 IGFBP- *Insulin Growth Factor 1 binding protein*
 IIs- Interleucinas
 KCl– Cloreto de potássio
 Kg – Quilogramas
 KH₂PO₄ – Hidrogenofosfato de potássio
 LH – Hormona luteinizante
 LPDA – Liga Portuguesa dos Direitos do Animal
 LPS - Lipopolissacarídeos
 mg – Miligramas
 min – Minutos
 ml – Mililitros
 mm - Milímetros
 mM – Milimolar
 MP – Medroxiprogesterona
 mRNA- RNA mensageiro
 Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio
 NaCl – Cloreto de sódio
 ng – Nanogramas
 °C – Graus centígrados
 OVH – Ovariohisterectomia
 p – Significância
 PAMP- padrões moleculares conservados
 PBS – *Phosphate Buffered Saline*
 PG – Prostaglandina
 PGE-2- Prostaglandina E 2
 PGF- 2 α - Prostaglandina F 2 α
 PGFM- Metabolitos de prostaglandina F
 pH – Potencial hidrogeniônio
 PU/PD- Poliúria e polidipsia
 RE – Receptores de estrogénio
 RP – Receptores de progesterona
 SFB – Soro Fetal Bovino
 SMAC/Diablo - *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct*
 TRADD- Tumor Associated Death Domain
 TRAIL- Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
 TBS - *Tris Buffered Saline*
 TdT- *Terminal deoxynucleotidyltransferase*
 TGF- α – *Transforming Growth Factor- α*
 TLR- *Toll-like receptors*
 TNF- Factor de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)
 TNFR– *Tumor Necrosis Factor Receptor*
 TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyltransferaseUTP Nick End Labeling*
 UTL– UniversidadeTécnica de Lisboa
 UV – Ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

A hiperplasia quística do endométrio (HQE) é uma das mais importantes e a mais frequente alteração do útero, sendo uma das causas mais frequente de infertilidade em cadelas de idade mais avançada (Mateus & Eilts, 2010). Os factores que desencadeiam a HQE ainda não estão completamente esclarecidos. Assume-se que possa ser causada, em parte, por uma resposta uterina exagerada à estimulação crónica e repetida de progesterona durante a fase lútea do ciclo éstrico em cadelas de meia-idade e idosas que, portanto, passaram por vários ciclos (Kooistra et al., 1997; Noakes et al., 2001; De Bosschere et al., 2001), embora os estrogénios possam potenciar o efeito da progesterona (Chen et al., 2001; Noakes et al., 2001). O facto da cadela possuir um diestro de duração aproximada de dois meses também a predispõe a HQE (Johnston et al., 2001). Niskanen e Thrusfield (1998) referem o risco aumentado de HQE em cadelas núlparas em relação a múltiparas.

A hiperplasia quística do endométrio é mais frequente em cadelas do que em gatas (Johnston et al., 2001; Noakes et al., 2001), uma vez que nas últimas a ovulação é induzida. O ciclo éstrico da cadela compreende alterações hormonais e morfológicas que envolvem a apoptose e proliferação celular. Estes mecanismos podem ser essenciais para manter a homeostasia do número de células no endométrio canino durante o ciclo éstrico e na remodelação dos tecidos durante a implantação do blastocisto e desenvolvimento da placenta, como foi demonstrado para outras espécies (Van Cruchten et al., 2003). Presume-se que os mecanismos envolvidos na etiologia da hiperplasia quística possam influenciar a proliferação celular e a apoptose dos diferentes tipos de células do endométrio.

Este estudo teve como objectivos gerais:

- 1- A avaliação dos índices de proliferação celular e de apoptose em endométrios com alterações de hiperplasia quística.
- 2- Comparação dos resultados obtidos com os índices de proliferação celular e de apoptose em endométrios sem alterações nas mesmas fases do ciclo éstrico.

O trabalho realizado inseriu-se no projecto “Contribuição para o estudo da fisiopatologia do complexo hiperplasia quística do endométrio-piometra na cadela”, subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)- PTDC/CVT/66587/2006 e no projecto CIISA/FMV 74- Hiperplasia do endométrio.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Aspectos da fisiologia ovárica e uterina

O ovário é considerado uma glândula exócrina e endócrina, visto que produz oócitos (secreção exócrina) e hormonas esteróides (secreção endócrina) (Moya Jimenez & Vidal, 2004).

O desenvolvimento do folículo está associado a um aumento do tamanho do oócito e alterações celulares que culminam na formação da granulosa e a teca folicular. Esta diferencia-se em duas zonas, uma interna, muito vascularizada e anexa ao folículo, a teca interna (carácter secretor) e a teca externa, constituída principalmente por tecido conjuntivo (Davison & Stabenfeldt, 2002).

Para que o desenvolvimento folicular ocorra é necessário que existam receptores para as gonadotrofinas, hormona foliculoestimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH). Os receptores para FSH e LH desenvolvem-se na granulosa e na teca, respetivamente. A presença de receptores diferentes para as gonadotrofinas nestas duas áreas resulta numa cooperação para a síntese de estrogénio (Davison & Stabenfeldt, 2002). A teca produz androgénios (testosterona e androstenediona) sob a influência de LH que se difundem através da membrana própria para a granulosa, onde são transformados em estrogénio (estradiol-17beta) (Davidson & Feldman, 2011). Durante o desenvolvimento folicular o estrogénio leva à formação de receptores adicionais para a FSH. Na fase final do desenvolvimento, a FSH e os estrogénios induzem a expressão de receptores para a LH na granulosa e o número de receptores de FSH começa a diminuir. O aumento da secreção de estrogénios pelo folículo antral resulta no início do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. Na parte final do desenvolvimento o folículo fica cada vez mais sob o controlo de LH, até ocorrer a ovulação (Davison & Stabenfeldt, 2002; Davidson & Feldman, 2011). A duração do pico de LH é cerca de 12 a 24 horas, provavelmente relacionado com a diminuição da concentração de estrogénio, à medida que os folículos respondem ao pico pré-ovulatório das gonadotrofinas (Davidson & Feldman, 2011).

Na cadela, a luteinização precoce da parede dos folículos induz um aumento da concentração de progesterona antes de ocorrer a ovulação (Davison & Stabenfeldt, 2002). Este aumento, que ocorre durante o estro, é importante para a expressão da receptividade sexual, após exposição prévia aos estrogénios durante o proestro. Durante o proestro as cadelas atraem os machos mas não estão receptivas (Davidson & Feldman, 2011). A parede do folículo, após a ovulação, colapsa e sofre várias alterações formando o corpo lúteo. A principal função do corpo lúteo é a secreção de progesterona, que prepara o útero

para o início e a manutenção da gestação (Davison & Stabenfeldt, 2002; Davidson & Feldman, 2011).

A cadela também se distingue das outras espécies devido ao corpo lúteo se manter funcional durante o mesmo período de tempo (50-80 dias) quer ocorra gestação ou não (De Cock et al., 1997a).

1.1. Ciclo éstrico

As cadelas são monoéstricas e geralmente não sazonais. O primeiro ciclo éstrico numa cadela é variável consoante a raça e mesmo dentro da própria raça. Estima-se que possa variar entre os 6 e os 14 meses, ainda que em algumas raças de porte grande possa apenas iniciar-se aos 18 a 24 meses (Feldman & Nelson, 2004). O intervalo entre ciclos éstricos também é variável, de 5 a 12 meses, com uma média de 6-7 meses, mas que pode ir de 4 a 13 meses de intervalo (Concannon, 2011; Davidson & Feldman, 2011).

O ciclo éstrico divide-se em quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro (Feldman & Nelson, 2004)

1.1.1. Proestro

Esta fase dura entre 6 a 11 dias, com uma média de 9 dias definida desde o início do corrimento vulvar sanguinolento até à aceitação do macho por parte da fêmea (Concannon, 2011). Nesta fase a fêmea atrai os machos mas não está receptiva. O corrimento sanguíneo deve-se à diapedese de eritrócitos dos vasos sanguíneos do endométrio e ruptura dos capilares subepiteliais (Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2011). No entanto, há cadelas em que o corrimento poderá não ser observado.

A síntese e secreção de estrogénio pelos folículos ovários em desenvolvimento leva a alterações rápidas no espessamento e desenvolvimento da mucosa vaginal e endométrio. A vulva fica também edemaciada e túrgida (Concannon, 2011; Davidson & Feldman, 2011). Na citologia vaginal observam-se células parabasais e intermédias pequenas no início de proestro, modificando-se para células superficiais queratinizadas, numa percentagem ainda assim inferior a 80% das células presentes, para o final do proestro (Feldman & Nelson, 2004) (tabela 2).

A concentração plasmática de estrogénio durante o anestro é cerca de 5 a 15 pg/ml, aumentando para concentrações superiores a 15 pg/ml durante o proestro (Davidson & Feldman, 2011). No início do proestro a concentração de estradiol situa-se acima dos 25 pg/ml, atingindo em média os 60 a 70 pg/ml no fim desta fase (Concannon, 2011). O pico da concentração de estradiol é atingida 24 a 48 horas antes do início do estro, mantendo-se em níveis baixos durante o estro (Onclin & Verstegen, 1999) (figura 1) (tabela 1).

O aumento das concentrações séricas de estrogénios durante o proestro leva a várias alterações, nomeadamente, o alongamento dos cornos uterinos, o espessamento do endométrio, abertura do cérvix, edema das pregas da mucosa vaginal e aumento do número de camadas de células na mucosa vaginal e edema e turgidez vulvar (Concannon, 2011). As alterações estruturais e de atividade glandular a nível do útero produzem um ambiente propício para a implantação do embrião, caso tenha havido fecundação (Feldman & Nelson, 2004).

1.1.2. Estro

Em termos comportamentais, o estro é caracterizado pela aceitação do macho pela fêmea, terminando quando esta já não é tolerada. Esta fase inicia-se quando os níveis de estrogénio começam a diminuir, cerca de 24 a 48 horas após o pico de estrogénio. (Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2011; Davidson & Feldman, 2011).

Nesta fase o útero aumenta de tamanho e espessura, podendo até tornar-se palpável. A vulva torna-se macia e flácida, embora continue edemacida e o corrimento vulvar poderá ser sanguinolento a mucoso. Citologicamente observa-se a presença de um número superior a 80-90% de células superficiais queratinizadas (Feldman & Nelson, 2004) (tabela 2).

A duração do estro é normalmente de 5 a 9 dias, embora possa durar apenas 1 a 2 dias ou atingir os 18 a 20 dias (Feldman & Nelson, 2004).

O aumento da progesterona e a diminuição de estrogénio levam, para além das alterações comportamentais do estro, ao feedback positivo sobre o hipotálamo e hipófise, resultando na secreção de FSH e, mais importante, LH no início do estro.

O pico de LH tem uma duração de 12 a 24 horas (Concannon, 1986), e por sua vez desencadeia a ovulação cerca de 24 a 48 horas depois (Concannon, 2011; Davidson & Feldman, 2011). As concentrações elevadas de FSH podem durar um a dois dias mais que as de LH, devido ao tempo de semi-vida superior desta (Rehm et al., 2007).

A concentração de progesterona, antes do pico de LH (24 a 48 horas) é geralmente superior a 1 ng/ml, chegando a 2-4 ng/ml (Davidson & Feldman, 2011) durante a sua ocorrência. No momento da ovulação pode atingir 4-10 ng/ml. Só então começa a ser produzida pelo corpo lúteo, continuando a aumentar por um período de 1 a 3 semanas (Feldman & Nelson, 2004). Por altura do dia 10 após o pico de LH ou imediatamente antes do fim do estro pode mesmo situar-se entre 10-25 ng/ml em média (Concannon, 2011) (tabela 1).

O aumento precoce da progesterona, condiciona a intensidade e duração do cio, como demonstrado em estudos de Concannon e colaboradores (1986) onde foram administrados implantes de progesterona em cadelas ovariectomizadas 6 horas depois de 9 injeções de estrogénio, resultado num comportamento de estro de 9 dias. Em cadelas onde não foi

administrada progesterona exógena, o estro durou apenas 5 dias após o estrogénio ter sido descontinuado (Concannon, 1986).

Como já referido, o estrogénio (estradiol) começa a diminuir durante esta fase e quando atinge os 15 pg/ml termina o estro (figura 1). Isto é evidente no comportamento da fêmea, citologia vaginal, espessura da parede vaginal e tamanho da vulva (Feldman & Nelson, 2004).

A testosterona atinge a máxima concentração perto da altura do pico de LH e da receptividade sexual. Após esta fase a concentração de testosterona diminui (Olson et al. 1984 citado por Nelson & Feldman, 2004). Ainda não se conseguiu provar se esta hormona contribui para o pico de LH ou para o comportamento típico desta fase do ciclo (Rehm et al., 2007).

1.1.3. Diestro

O diestro é definido como a fase de dominância da progesterona. Inicia-se após o fim do estro e termina quando a concentração de progesterona diminui para níveis inferiores a 1ng/ml. Também se caracteriza por alteração da citologia vaginal- de uma fase de 80 a 100% de células superficiais para uma de 80 a 100% de células parabasais e intermédias (Feldman & Nelson, 2004) (tabela 2).

Com a formação do corpo lúteo a concentração de progesterona aumenta, atingindo o seu máximo aos 20 a 30 dias após a ovulação. Um “plateau” transitório persiste durante cerca de 1 a 2 semanas, com níveis de progesterona que podem ir de 15 a 90 ng/ml. (Rehm et al., 2007; Concannon, 2011). A partir deste período a concentração de progesterona começa a diminuir até níveis basais inferiores a 1ng/ml entre os dias 55-90 (média de 70 dias) (Concannon, 2011) (figura 1) (tabela 1).

O útero responde ao aumento da concentração de progesterona mantendo a vascularização e estrutura glandular requerida à manutenção da gestação independentemente da fêmea ter sido fecundada ou não. O volume máximo do útero numa cadela não gestante é atingido por volta dos 20 a 30 dias após o cio, o que coincide com a concentração máxima de progesterona. No início do diestro as diferenças uterinas entre cadelas gestantes e não gestantes são insignificantes (Feldman & Nelson, 2004; Rehm et al., 2007).

Com o declínio da função lútea a concentração da progesterona diminui progressivamente. O corpo lúteo de cadelas não gestantes tem uma duração superior (60-70 dias) ao das cadelas gestantes (56-58 dias) (Johnston et al., 2001; Davidson & Feldman, 2011). A fase lútea termina abruptamente nas cadelas gestantes (aproximadamente 64-66 dias após o pico de LH), de modo a que o parto possa ser desencadeado.

A causa da luteólise no fim do diestro não é bem compreendida, embora se pense que seja mediada por mecanismos apoptóticos, sem aparente aumento na produção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo útero (Concannon, 2011).

Vários autores descrevem uma secreção episódica de LH e FSH pela hipófise durante o diestro, mas acreditam que a LH não seja um factor importante para a manutenção da função lútea. Na cadela, a prolactina é o factor luteotrófico durante a segunda metade da fase lútea (Kooistra et al., 1999; Feldman & Nelson, 2004; Concannon, 2011; Davidson & Feldman, 2011).

As concentrações de prolactina variam pouco durante a maior parte do ciclo da cadela não gestante. À medida que as concentrações de progesterona diminuem na última metade do diestro, as concentrações de prolactina podem aumentar até ao dobro (figura 1).

A hipertrofia mamária e o aumento da atividade secretória durante o diestro está associada à prolactina. Esta hormona está também implicada nos sinais clínicos de pseudo-gestação (Concannon, 1986; Kooistra & Okkens, 2002; DeCoster et al., 1983, citado por Feldman e Nelson, 2004; Rehm et al., 2007).

1.1.4. Anestro

No fim do diestro e durante o anestro, o útero passa por um período de involução e reparação, o que pode demorar vários meses, facto que determina o longo período inter-éstrico na cadela. A sua duração é variável, consoante a raça, idade, altura do ano, ambiente, entre outros factores (Feldman & Nelson, 2004; Okkens & Kooistra, 2006).

A citologia vaginal típica desta fase caracteriza-se por um número reduzido de células pequenas parabasais e intermédias (Feldman & Nelson, 2004) (tabela 2).

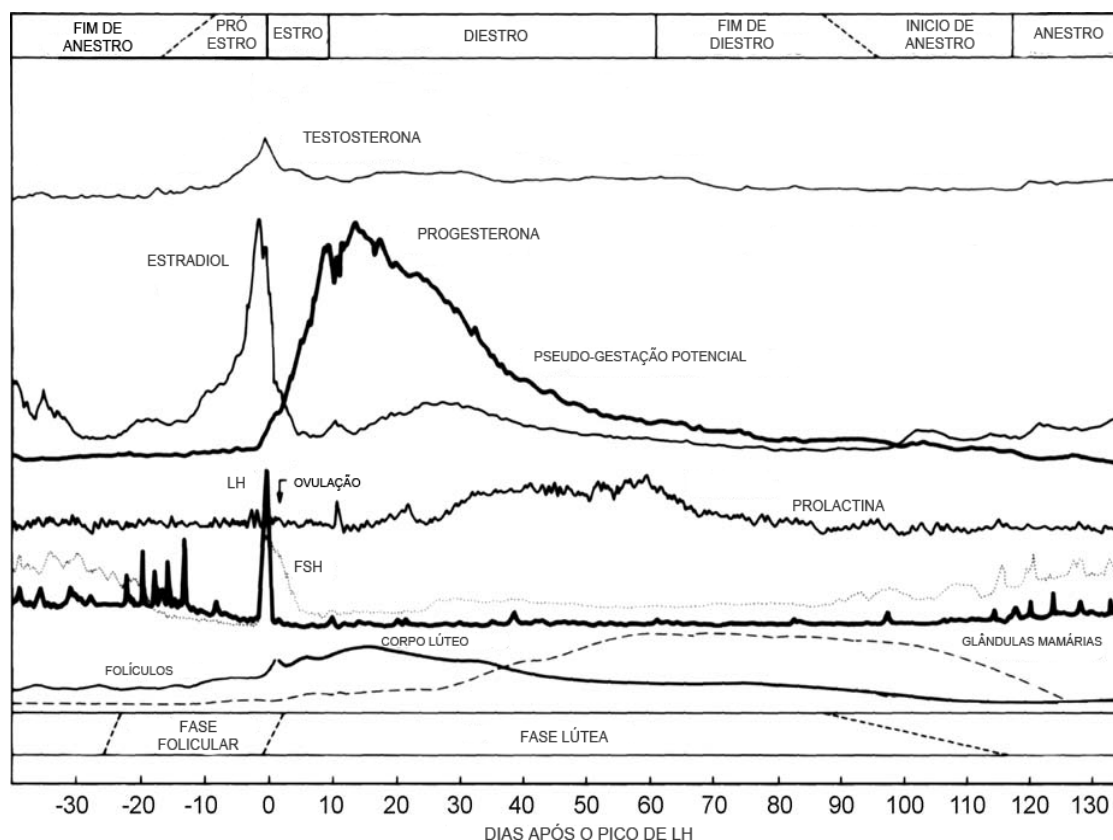
O anestro pode demorar 120 a 130 dias nas cadelas não gestantes, e cerca de 140 dias nas cadelas que estiveram gestantes. Tipicamente dura cerca de 4 a 5 meses (Concannon, 2011).

Pequenas elevações da secreção de LH são observadas durante o último terço do anestro, observando-se um pequeno pico de LH imediatamente antes do início do proestro. A concentração sérica de FSH mantém-se elevada durante o anestro, ocorrendo pequenos picos no final do anestro (Feldman & Nelson, 2004, Rehm et al., 2007) (figura 1).

As concentrações de estrogénio variam durante o anestro. Foram observados picos de estrogénio que se pressupõem serem derivados das ondas de desenvolvimento folicular e que são de pouca duração e sem expressão. As concentrações séricas de estrogénios diminuem antes do início do proestro. Em contraste, a progesterona mantém-se sempre em concentrações extremamente baixas, durante toda esta fase (Feldman & Nelson, 2004), sendo inferior a 1ng/ml (Concannon, 2011) (figura 1) (tabela 1).

Não se conhece ainda que factor ou factores iniciam o proestro e o ciclo éstrico seguinte. Pensa-se que possa estar envolvida uma influência dopaminérgica, dado que a administração de agonistas de dopamina encurtam o anestro e estão associadas ao aumento das concentração de FSH, e diminuição das concentrações de prolactina. A coordenação de eventos que levam à ovulação tem sido difícil de reproduzir laboratorialmente (Okkens & Kooistra, 2006).

Figura 1 - Representação esquemática das alterações observadas nas concentrações hormonais durante as diferentes fases do ciclo éstrico da cadela.



Legenda-Os valores basais e as concentrações mais elevadas representados são, respectivamente: Estradiol: 5-10 e 45-120 pg/ml; Progesterona: 0,2-0,5 e 15-60 ng/ml, LH: 0,4-1,5 e 5-40ng/ml; FSH: 15-40 e 200-400ng/ml; Prolactina: 0.5-2 e 5-30ng/ml; Testosterona: <0.5 e 2-5ng/ml (adaptado de Concannon, 2011).

Tabela 1 - Concentrações de progesterona e estrogénio durante o ciclo éstrico (adaptado de Feldman e Nelson, 2004; Concannon 2011)

	Proestro	Estro	Início diestro	Meio diestro	Fim de diestro	Anestro
Progesterona (ng/ml)	<1	2-10	>20	20-10	Diminui até 1	<0.5
Estrogénio (pg/ml)	25-120	Diminui até 15	<15	<15	<15	5-15

Na tabela 2 estão esquematizadas as variações na citologia vaginal durante as quatro fases do ciclo éstrico:

Tabela 2 - Citologia vaginal do ciclo éstrico da cadela (adaptado de Feldman e Nelson, 2004)

Fase do ciclo	Eritrócitos	Neutrófilos	Bactérias	Células Epiteliais
Início proestro	Frequentes	Frequentes	microflora mista	Células parabasais e intermédias pequenas
Fim proestro	Frequentes	Ausentes ou poucos	microflora mista	<80% células superficiais queratinizadas
Estro	Presentes, a diminuir de número	Ausentes	microflora mista	>80-90% células superficiais queratinizadas
Diestro	Ausentes ou raros	De alguns a muitos	microflora reduzida	Células parabasais e intermédias
Anestro	Ausentes ou raros	Ausentes ou presentes	Se presentes (microflora normal)	Células parabasais e intermédias pequenas em número reduzido

1.2. Alterações histológicas do útero durante o ciclo éstrico

A camada externa peritoneal que cobre o útero denomina-se perimétrio, que é formado por tecido conjuntivo laxo, recoberto por mesotélio, e que contém fibras musculares lisas e vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Moya Jimenez & Vidal, 2004).

O miométrio é constituído por duas camadas de músculo liso, uma externa fina longitudinal e uma camada mais grossa interna circular, separadas por uma rede de vasos sanguíneos, que também irrigam o endométrio (Stone, 2003; Moya Jimenez & Vidal, 2004).

A camada mais interna do útero é o endométrio. Compreende o estroma de tecido conjuntivo laxo muito vascularizado, que contém glândulas uterinas tubulares ramificadas que abrem para o lúmen uterino (Stone, 2003). Nos carnívoros, o epitélio luminal ou glandular é de tipo simples cúbico ou cilíndrico. A altura das células epiteliais varia com a fase do ciclo éstrico (Moya Jimenez & Vidal, 2004).

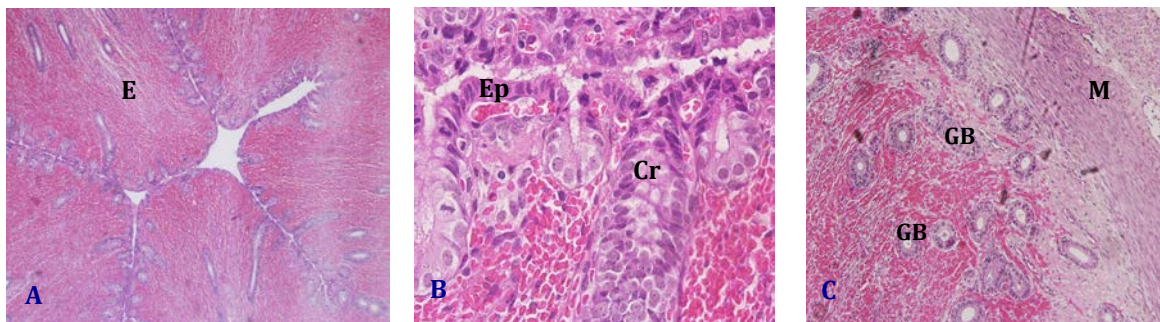
O estroma contém uma grande quantidade de macrófagos, principalmente no início do proestro, no fim do diestro e no anestro. Perto da túnica muscular esta zona torna-se mais densa, com maior quantidade de fibras de colagénio. (Moya Jimenez & Vidal, 2004).

Histologicamente, o útero manifesta as seguintes alterações nas diferentes fases do ciclo:

Proestro: o estroma do endométrio evidencia progressivamente espessamento edematoso de distribuição irregular que se traduz por lúmen em forma de X ou cruz, em corte transversal. A intensa proliferação celular observada no estroma, no epitélio luminal e nas glândulas basais está associada com as concentrações elevadas de estradiol que caracterizam esta fase. O epitélio luminal forma invaginações superficiais para o interior do

estroma, dando origem a criptas (Rehm et al., 2007). O miométrio também se encontra mais espessado com células do músculo liso hipertrofiadas e de coloração eosinofílica (Chandra & Adler, 2008). Nesta fase, verifica-se aumento da hiperémia capilar, associada à extravasão de eritrócitos para o lúmen uterino, contribuindo para o corrimento vaginal sanguinolento (figura 2).

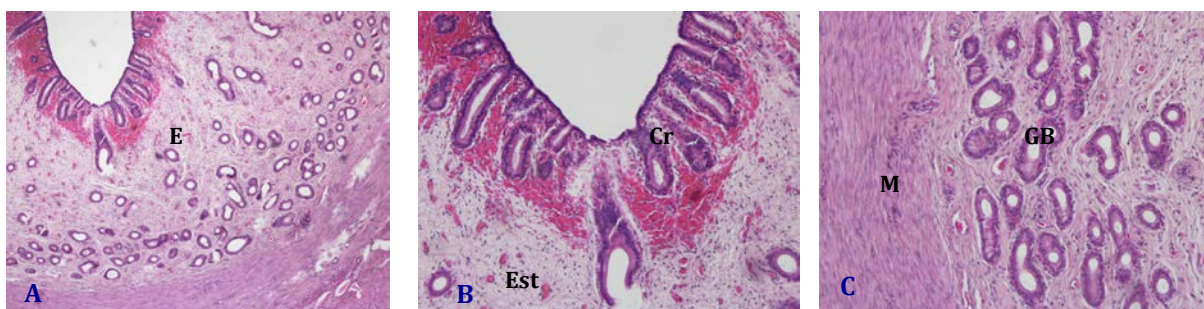
Figura 2 - Cortes histológicos do útero durante o proestro (coloração H&E)



Legenda: A- Endométrio (E) edematoso (forma de cruz) (40x) ; B- Epitélio luminal (Ep) e criptas (Cr) (invaginações do epitélio no estroma) (400x), C- Glândulas basais (GB) em maior número e hiperémia (100x). M- Miométrio (fotos cedidas por Cruz, 2011)

Estro: no início desta fase o endométrio ainda apresenta aspecto edematoso, que gradualmente se vai atenuando após a ovulação. Verifica-se, no entanto, aumento do conteúdo em colagénio no estroma, aumento do número de glândulas basais e apicais, que apresentam função secretora, e proliferação e hipertrofia das células musculares lisas (Rehm et al. 2007, Chandra & Adler, 2008) (figura 3).

Figura 3 - Cortes histológicos do útero durante o estro (coloração H&E)



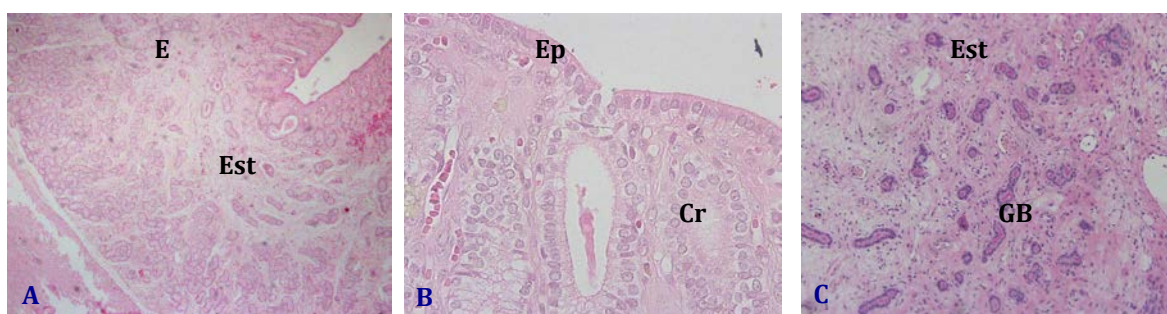
Legenda: A- Endométrio (E) menos edematoso que na fase anterior (40x); B- Glândulas apicais (Criptas-Cr) em maior número, estroma (Est) (100x). C- Glândulas basais (GB) em maior número (100x); M- Miométrio (fotos cedidas por Cruz, 2011).

Diestro: No início do diestro, o endométrio e o miométrio atingem a sua maior densidade celular e espessura. As células do epitélio luminal e das criptas demonstram uma morfologia distinto epitélio das glândulas basais, tendo estas últimas uma aparência enovelada (Rehm et al., 2007). No início de diestro, as células das criptas são cilíndricas e com núcleo

fracamente basofílico; passando o citoplasma a ter aspecto vacuolizado, na segunda metade do diestro, devido à acumulação de lípidos neutros no citoplasma (Galabova et al., 2003; Chandra & Adler, 2008). O estroma é caracterizado por uma grande densidade de fibras de colagénio (Rehm et al., 2007) (figura 4).

A regressão das alterações celulares ao nível das glândulas e do estroma iniciam-se durante a 3ª semana de diestro e são marcadas pelo achatamento do epitélio glandular basal e diminuição de colagénio no estroma, bem como por uma apoptose extensa e generalizada dos diferentes compartimentos celulares. Durante o diestro, podem ser observadas secreções glandulares eosinofílicas e depósitos intersticiais de pigmento amarelo (hemosiderina) (Rehm e tal., 2007).

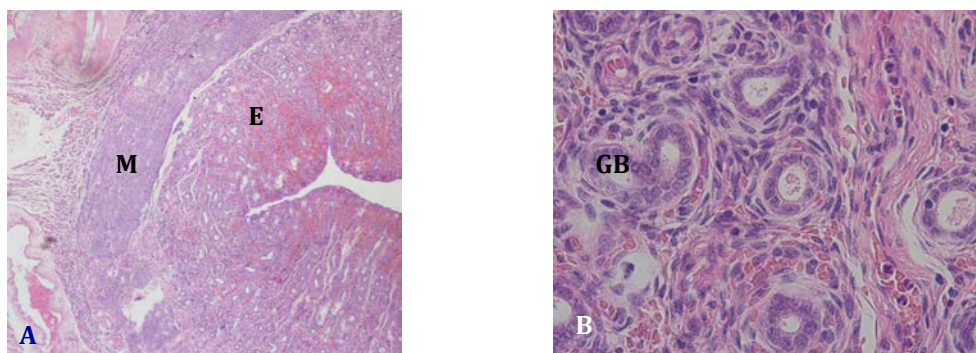
Figura 4 - Cortes histológicos do útero durante o diestro (coloração H&E)



Legenda: A- Endométrio (E) com estroma (Est) denso em fibras de colagénio no início de diestro (40x) B- epitélio luminal (Ep) e criptas (Cr) no início de diestro (100x), C- glândulas basais (GB) e estroma (Est) no final de diestro (40x) (fotos cedidas por Cruz, 2011).

Anestro: Ao longo do anestro, observa-se uma atrofia progressiva do endométrio e do miométrio. A redução do citoplasma das células, resulta num endométrio com elevada densidade nuclear (Rehm, 2007) (figura 5).

Figura 5 - Cortes histológicos do útero durante o anestro (coloração H&E)



Legenda: A- Endométrio (E) com elevada densidade nuclear (40x); B- glândulas basais (GB) com redução do citoplasma das células (400x); M- miométrio (fotos cedidas por Cruz, 2011).

2. Apoptose

O termo apoptose foi originalmente proposto por Kerr et al. (1972) para descrever um padrão de alterações morfológicas associadas à morte celular programada e alguns processos patológicos *in vivo*. Estas alterações incluem diminuição do volume celular e perda de contacto com as células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, fragmentação do núcleo, formação de prolongamentos da membrana plasmática e nuclear, e condensação da cromatina. Finalmente a célula fragmenta-se em corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos tecidulares (Wyllie et al., 1980; McConkey, 1998; Saraste & Pulkki, 2000; Kiechle et al., 2002; Van Cruchten et al., 2003). A apoptose não desencadeia um processo inflamatório, por não existir perda da integridade membranar (Saraste & Pulkki, 2000). Uma característica importante é que estas alterações podem ser facilmente diferenciáveis das que ocorrem durante a morte celular “acidental” (necrose) (Wyllie et al., 1980; McConkey, 1998) (tabela 3).

Ao contrário do processo de apoptose, a necrose celular ocorre rapidamente após o estímulo inicial (Kiechle & Zhang, 1998), e provoca uma intensa reação inflamatória associada com a libertação das enzimas citoplasmáticas para o espaço extracelular, após ruptura da célula (McConkey, 1998; Van Cruchten et al., 2003).

Na tabela 3 estão descritas as principais diferenças morfológicas e funcionais entre a apoptose e a necrose celular.

Tabela 3 - Diferenças morfológicas e funcionais entre a apoptose e a necrose celulares (adaptado de Allen et al., 1997; McConkey, 1998)

Apoptose	Necrose
Processo activo	Processo passivo
Retração, condensação e desidratação citoplasmática celular, organelos normais	Aumento do volume celular, do retículo endoplasmático e mitocôndrias
Fragmentação do ADN internucleossómico	Degradação difusa do ADN, degradação das histonas
Condensação da cromatina	Lise da cromatina
Membrana citoplasmática intacta	Ruptura da membrana citoplasmática
Não induz inflamação	Induz inflamação

A apoptose tem um papel importante na regulação do número de células durante o desenvolvimento e a homeostasia do tecido (Allen et al., 1997; Meier et al., 2000). A desregulação deste processo está associada a neoplasias, doenças auto-imunes e neurodegenerativas, alterações hematopoiéticas e infertilidade (Allen et al., 1997; Kiechle et Zhang, 2002).

2.1. Mecanismos apoptóticos- morte celular programada

A apoptose pode ser dividida em 3 fases que são bioquímica e morfologicamente distintas: a primeira, onde a existência de sinais intra ou extra celulares compromete as células para o processo de morte (fase de iniciação); a segunda, onde há activação das proteases intracelulares que executam a morte celular, induzindo as características alterações nucleares (fase efectora); e uma última, onde as células mortas e os corpos apoptóticos são fagocitados e degradados (fase de degradação) (Marti *et al.*, 1999; Saikumar *et al.*, 1999; Saraste & Pulkki, 2000). Em condições fisiológicas, a ocorrência de apoptose nos tecidos é um acontecimento raro. Como tal, apenas algumas células em apoptose são observadas num certo instante num determinado local (Saraste & Pulkki, 2000).

Embora o mecanismo exacto de iniciação da apoptose *in vivo* permaneça pouco claro, a resposta é dependente de um estímulo activador (“trigger-dependent”) e é específica para cada célula alvo. É pouco provável que a activação ou inactivação de apenas um componente da cascata de apoptose altere o destino final da célula (Huerta et al., 2007).

A activação da apoptose pode ocorrer por duas vias diferentes: via extrínseca (ou citoplasmática) e via intrínseca (mitocondrial) (Kiechle & Zhang, 2002).

2.1.1. Via extrínseca

Esta via requer a ligação de um ligante a um receptor de morte com localização membranar. Por exemplo, o factor de necrose tumoral (TNF) liga-se ao seu receptor de morte (receptor TNF de tipo I -TNFR 1), que leva ao recrutamento de duas moléculas transdutoras de sinal: a proteína de TNFR 1 associada ao domínio de morte (TRADD) e uma proteína Fas-associada ao domínio de morte (FADD) (Kiechle & Zhang, 2002; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002). O recrutamento destas duas moléculas também pode ser realizado pela ligação do ligando indutor de apoptose tipo TNF (TRAIL) a receptores de morte (DR - *death receptors*) DR4 e DR5, ou de ligandos FasL a receptores Fas (Huerta et al., 2007). A FADD não possui apenas um domínio de morte (DD) mas também outro domínio designado por complexo sinalizador indutor de morte (*death-inducing signaling complex* - DISC) (Kumar et al., 2005).

Estes complexos ligam-se à pró-caspase (*cysteinyI aspartate-specific protease*) 8 o que leva à activação da caspase 8 e 10, iniciando a cascata de proteases que leva à apoptose. (Kiechle & Zhang, 2002; Huerta et al., 2007). O complexo que compreende o receptor de morte, moléculas adaptadoras e caspase-8 foi designado por apoptossoma iniciador (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

As caspases (proteases específicas) são agrupadas em caspases iniciadoras (8 e 10) e caspases executadoras (3, 6 e 7) (Saraste & Pulkki, 2000; Huerta et al., 2007). As caspases

têm capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos de aspartato, levando à condensação e fragmentação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e exposição dos fosfolípidos membranares à superfície, o que leva ao reconhecimento e fagocitose pelos macrófagos (Grivich et al., 2007).

A via de apoptose extrínseca pode utilizar igualmente a libertação de citocromo C. Em algumas situações a caspase 8 pode clivar Bid, um membro do subgrupo de domínio único BH3 da família Bcl-2 (mediador anti-apoptótico), para uma forma truncada tBid, que se liga a outra proteína relacionada com Bax, a Bak (mediadores apoptóticos), para libertar o citocromo C e desencadear a activação da caspase 3 pela via intrínseca (Kiechle & Zhang, 2002; Huerta et al., 2007) (figura 6).

2.1.2. Via intrínseca

A libertação de citocromo C da intermembrana mitocondrial para o citosol é o evento chave da iniciação da via intrínseca da apoptose (Otsuki, 2001; Kiechle & Zhang, 2002, Huerta et al., 2007).

Após o estímulo inicial (stress celular causado por hipóxia, deficiência em nutrientes ou factores de crescimento, radiações ultra-violeta, agentes quimioterápicos, mutações de ADN, etc), a apoptose pode ocorrer imediatamente ou ser retardada. Este atraso poderá estar relacionado com o tempo de libertação de citocromo C, após a alteração no potencial transmembranar mitocondrial (Kiechle & Zhang, 2002; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

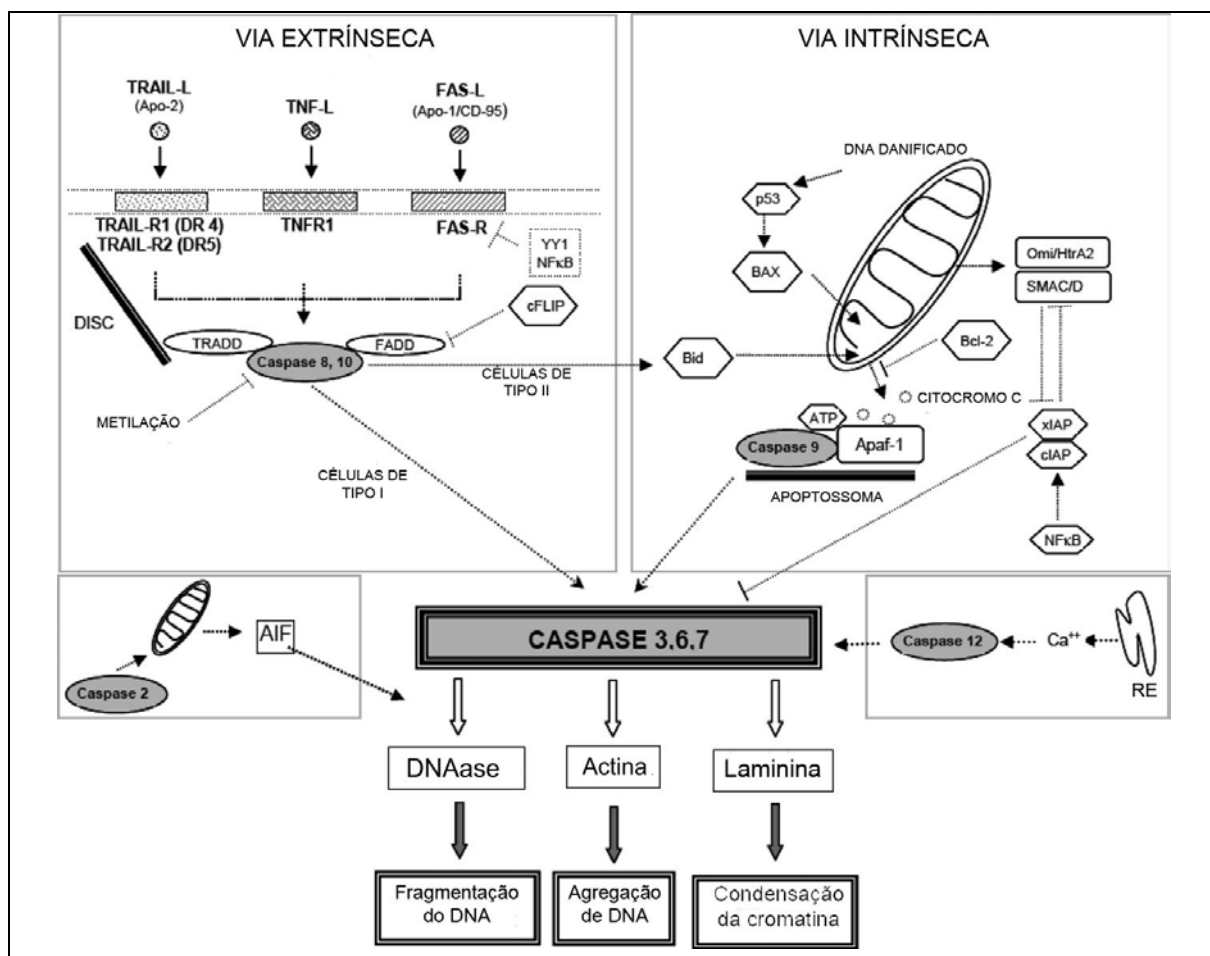
A resposta às alterações no ADN podem ou não ser dependentes da presença do factor de transcrição nuclear p53. Genes induzidos por p53 incluem os genes que codificam para Bax e para a proteína homóloga Bcl-2 que podem oligomerizar e formar poros na membrana mitocondrial externa, resultando tanto numa diminuição do potencial transmembranar interno mitocondrial, como na abertura dum canal aniónico, libertando o citocromo c do espaço entre as membranas mitocondriais externa e interna (Kiechle & Zhang, 2002). A permeabilidade da membrana mitocondrial ao citocromo C é determinada pela relação relativa entre mediadores pro-apoptóticos (ex: Bax ou Bak) e anti-apoptóticos (ex: Bcl-2) (Huerta et al., 2007). O citocromo C citosólico induz a formação de um apoptossoma composto por um factor de activação da protease apoptótica-1 (Apaf-1), pró-caspase 9 e adenosina trifosfato (ATP) ou dATP (McConkey, 1998; Otsuki, 2001; Kiechle & Zhang, 2002; Kumar et al., 2005). A activação da caspase 9 sem o envolvimento do apoptossoma também foi descrita (McConkey, 1998; Huerta et al., 2007). De igual modo, a pro-caspase 9 activada não é necessária para o apoptossoma recrutar as pró-caspases 3, 6 e 7 e ativá-las, por clivagem, a caspases 3, 6 e 7, que por sua vez removem o inibidor da desoxirribonuclease (DNAase) activada pela caspase, com consequente fragmentação do ADN (Kiechle & Zhang,

2002). As caspases 3, 6 e 7 influenciam também a produção de actina e laminina, com consequentes agregação do ADN e condensação da cromatina, respectivamente (Otsuki, 2001) (figura 6).

Este passo é seguido pela translocação de fosfatidilserina localizada no folheto interno na membrana plasmática que passa para o folheto externo. Esta translocação facilita o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos e a sua fagocitose, antes da integridade da membrana plasmática estar perdida, ao contrário do que acontece nas células necróticas (McConkey, 1998; Allen et al., 1997).

Outros conteúdos mitocondriais e do retículo endoplasmático são libertados, influenciando este processo (McConkey, 1998), mas o seu estudo aprofundado sai do âmbito desta dissertação.

Figura 6- Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (adaptado de McConkey, 1998)



Legenda- Vias de activação da apoptose. TNF- factor de necrose tumoral, TNFR- receptor de factor de necrose tumoral; FAS- receptores da morte; proteína de TNFR 1 associada ao domínio de morte (TRADD) e proteína Fas-associada ao domínio de morte (FADD); ligando indutor de apoptose tipo TNF (TRAIL); complexo sinalizador indutor de morte (DISC); mediadores pró-apoptóticos (Bax) e anti-apoptóticos (Bcl-2); caspases iniciadoras (8 e 10) e caspases executoras (3, 6 e 7), APAF-1-factor de activação da protease apoptótica; ATP- Adenosina Trifosfato; RE- reticulo endoplasmático; DNAase- desoxirribonuclease.

Vários métodos estão descritos para monitorizar os diferentes passos das vias de apoptose (Kiechle & Zhang, 2002). O método utilizado neste estudo designa-se por TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling*). Este teste é baseado na ligação específica de desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) a terminações livres 3'-OH de ADN fragmentado (Otsuki, 2001). Os nucleotidos terminais modificados amplificam os sinais permitindo a visualização das células marcadas por microscopia óptica de luz ou de fluorescência, citometria de fluxo ou imunohistoquímica (Saraste & Pulkki, 2000). A vantagem deste método é permitir a quantificação da apoptose pela avaliação do número de núcleos marcados em relação ao número de células contadas, resultando num índice de apoptose; e poder ser usado em células de cultura, cortes de congelação de tecidos, tecidos fixados em formalina, células do sangue, etc (Otsuki, 2001; Chu et al., 2006; Huerta et al., 2007).

2.2. Apoptose no endométrio canino durante o ciclo éstrico

A apoptose que ocorre no endométrio durante o ciclo éstrico está relacionada com as alterações das concentrações das hormonas esteroides produzidas pelos ovários. Em todas as fases do ciclo éstrico, as células do epitélio luminal e as células do estroma apresentam um índice apoptótico bastante reduzido (Van Cruchten et al., 2003; Chu et al., 2006; Cruz, 2011). Em contraste o índice apoptótico é moderado no final de diestro e anestro nas criptas e células do estroma. O aumento do número de macrófagos observado no endométrio parece estar associado à fagocitose das células do estroma que sofreram apoptose (Chu et al., 2006). No entanto, os maiores índices de apoptose foram detectados no epitélio das glândulas basais entre os dias 12 a 42 do diestro (Chu et al., 2006). Estes resultados e o facto da proliferação ser apenas notada durante o proestro e nos primeiros 10 dias de diestro, sugere que, na cadela, a apoptose é responsável pela regressão glandular no endométrio (Van Cruchten et al., 2003; Chu et al., 2006; Cruz, 2011).

No final do diestro, entre os dias 42 e 49, observam-se alterações degenerativas no epitélio luminal que precedem o aumento do índice apoptótico nas células endoteliais dos capilares, sugerindo que a redução do aporte sanguíneo possa ter um papel na degenerescência das células luminas (Chu et al., 2006). Pensa-se que isto esteja relacionado com a diminuição da concentração plasmática da progesterona (Chu et al., 2001a, 2001b, e 2002b). O tempo requerido para a involução do epitélio luminal oferece uma explicação para a infertilidade que se pensa estar associada a intervalos inter-éstricos curtos.

Nas várias espécies, a apoptose no endométrio parece ser regulada por hormonas esteroides. Na mulher e no coelho, a apoptose no epitélio superficial pode ser induzida pela remoção de progesterona após estimulação prévia do endométrio pelo estradiol em combinação com a progesterona. No hamster, rato e cobaio, a apoptose das células do

epitélio luminal é causada pela remoção da estimulação pelo estrogénio e pode ser prevenida pela administração de estrogénio e/ou progesterona. No entanto, na cadela, a associação entre os níveis hormonais e a apoptose é um assunto controverso. Van Cruchten e colaboradores (2003) não encontraram correlação entre o índice de apoptose e as concentrações de progesterona. No entanto, no estudo de Chu e colaboradores (2006), um aumento significativo no índice de apoptose foi observado nas glândulas basais na primeira metade do diestro, quando as concentrações de progesterona e dos seu receptores são elevadas. Pouca ou nenhuma apoptose foi observada no epitélio luminal, altura em que as concentrações de progesterona e o número dos seu receptores estão a diminuir. Na opinião de Van Cruchten e colaboradores (2003), a regulação da apoptose no endométrio canino é provavelmente afectada por outros factores para além das hormonas esteroides.

2.3 Apoptose no endométrio da mulher durante o ciclo éstrico

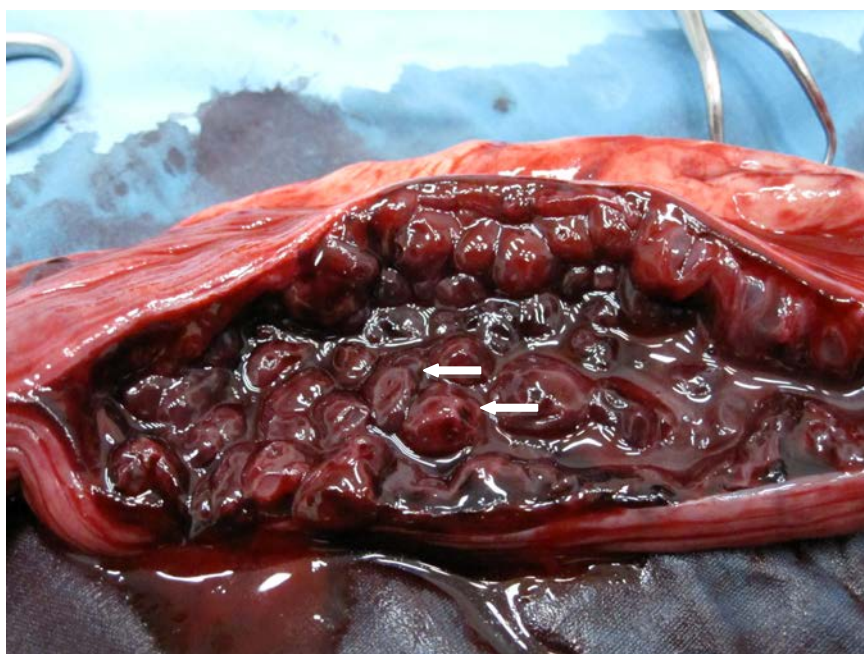
Na mulher, o ciclo éstrico é dividido em três fases: proliferativa, secretora e menstrual. A apoptose é pouco observada na primeira fase, começa a aumentar na segunda fase e é particularmente marcada na fase menstrual. O índice apoptótico é mais evidente nas células epiteliais luminais do endométrio. A variação da apoptose durante o ciclo está relacionada com a relação da expressão de Bcl-2 e Bax. Bcl-2 protege as células da apoptose, enquanto Bax aumenta a sua susceptibilidade. A diminuição da relação destas duas proteínas, que se verifica a partir do início da fase secretora, explica o aumento da apoptose na última fase. A interacção de Fas e Fas-L também é importante para o desencadeamento da apoptose (Harada et al., 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que a apoptose é induzida pela progesterona nas células endometriais humanas neoplásicas muito indiferenciadas. Também neste estudo, a diminuição dos níveis de Bcl-2 coincidiu com um aumento significativo do número de células apoptóticas nas glândulas do endométrio em pacientes tratadas com dispositivo intrauterino de levonorgestrol o que prova que a atividade apoptótica é induzida pelo tratamento progestagénico. Este resultado interessante, que revela acumulação oposta de proteínas apoptóticas nas glândulas e no estroma antes e depois da terapêutica progestagénica, pode indicar comunicações cruzadas entre as várias vias moleculares sinalizadoras nos diferentes compartimentos tecidulares (Vereide et al., 2005).

3. Hiperplasia quística do endométrio (HQE)

A hiperplasia quística do endométrio define-se como um conjunto de alterações no útero, como a presença de glândulas quísticas com morfologia, número, distribuição e relevância clínicas variáveis, por vezes com presença de conteúdo uterino mucoso ou seroso, geralmente estéril, mas que pode evoluir para inflamatório ou mesmo purulento (piómetra), com alterações endometriais inflamatórias, hiperplásicas ou atróficas correspondentes (De Bosschere et al., 2001; Noakes et al., 2001; Schlafer & Gifford, 2008) (figura 7).

Figura 7 - Aspecto macroscópico de útero com HQE



Legenda: Lúmen uterino de cadela com múltiplos quistos de tamanho variável (setas) e conteúdo luminal hemorrágico.

3.1. Classificação

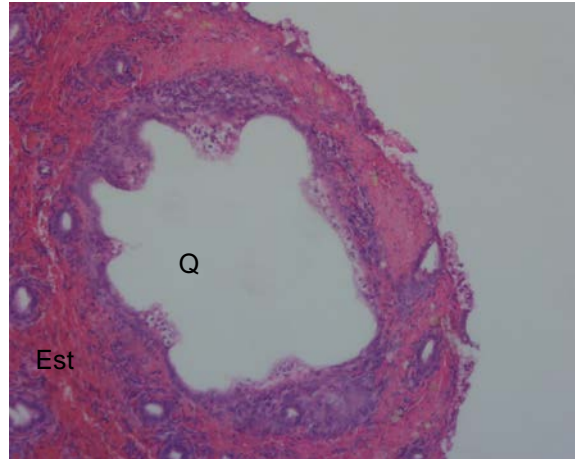
Dow (1958, 1959) descreve pela primeira vez, com base histológica, quatro fases do que considerou ser o complexo Hiperplasia quística-Piômetra, ao constatar que a hiperplasia quística seria um estadio precoce que iria, numa fase avançada, levar ao aparecimento de infecção uterina (piômetra).

O estadio I corresponde a uma HQE não complicada. O útero apresenta parede espessada e identifica-se número variável de quistos com cerca de 4 a 10mm diâmetro distribuídos pelo endométrio, que se encontra hipertrofiado. Não existe infiltração inflamatória em nenhuma camada da parede uterina (tabela 4) (figura 8).

No estadio II o útero apresenta a parede ligeiramente mais espessada particularmente ao nível do endométrio e para além de quistos irregulares pode conter ainda formações

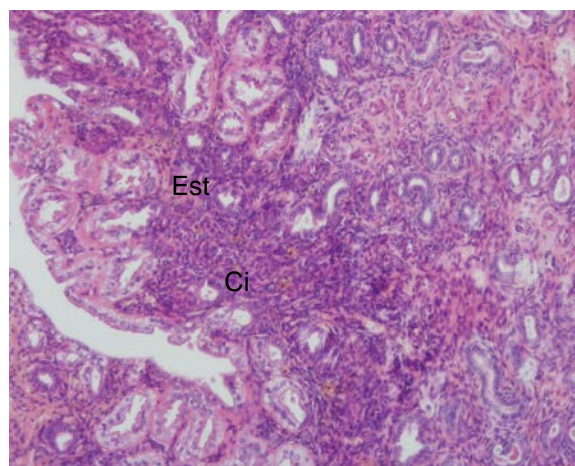
polipóides. Histologicamente observa-se já uma infiltração do estroma por células plasmocitárias, linfocitárias e macrófagos que estão concentradas ao nível das criptas e áreas sub-epiteliais. Nesta fase ainda não se observa destruição tecidual, atividade fibroblástica e exsudação celular para o lúmen das glândulas (Dow, 1958,1959) (tabela 4) (figura 9).

Figura 8 - Corte histológico de útero com HQE de grau I (coloração H&E)



Legenda: Quisto do endométrio (Q), estroma (Est) sem infiltração de células inflamatórias (100x)

Figura 9 - Corte histológico de útero com HQE de grau II (coloração H&E)



Legenda: Endométrio com infiltração de células inflamatórias (Ci) no estroma (Est) que rodeia as criptas (100x)

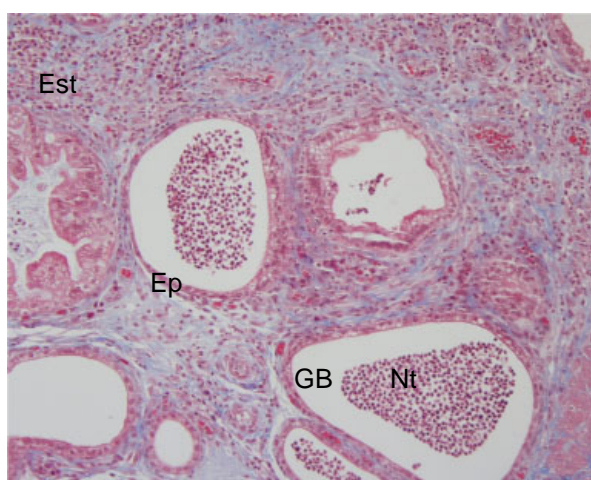
O estadio III já engloba uma reação inflamatória aguda do endométrio que se sobrepõe a um grau variável de hiperplasia quística. A parede uterina está hipertrofiada, embora possam existir áreas com atrofia. A superfície do endométrio tem aparência rugosa apresentando quistos com conteúdo purulento, bem como hemorragias focais e áreas de ulceração. O conteúdo intra-uterino tem coloração que varia entre o amarelo esverdeado e o vermelho acastanhado. Histologicamente, ocorre uma infiltração por polimorfonucleares

neutrófilos no estroma e glândulas, particularmente intensa na área das criptas. Em casos mais avançados, esta reação inflamatória pode estender-se a camadas mais profundas do endométrio, chegando a formar-se abscessos em glândulas com ductos bloqueados, ou estendendo-se até mesmo ao miométrio (Dow, 1958,1959) (tabela 4).

Já o estadio IV engloba casos de endometrite crónica. Em alguns úteros, o cérvix está suficientemente patente para permitir a drenagem do conteúdo intra-uterino, noutros casos encontra-se encerrado. Isto dá origem a que, no primeiro caso se verifique espessamento da parede uterina mas sem o útero ficar muito distendido, pois a quantidade de conteúdo luminal purulento é menor. No segundo caso, existe uma distensão maior do útero com conteúdo purulento, com atrofia da parede uterina, de tal modo que as características estruturais tornam-se difíceis de identificar. Histologicamente, no primeiro caso temos hipertrofia do miométrio e fibrose, atrofia do endométrio, menor número de estruturas glandulares e fibrose do estroma com infiltração de linfócitos e algumas células plasmocitárias. No caso de cérvix fechado, o endométrio está de tal modo atrofiado que só algumas fibras de colagénio estão presentes entre o epitélio superficial e o miométrio. Em alguns casos verifica-se metaplasia escamosa do endométrio. As glândulas são raras, o miométrio está igualmente atrofiado com alongamento das fibras musculares (Dow 1958, 1959) (tabela 4) (figura 10).

Payan Carreira e Pires (2005) referem igualmente a possibilidade de ocorrência concomitantemente de hiperplasia e atrofia, em zonas diversas do endométrio no útero.

Figura 10 - Corte histológico de útero com HQE de grau IV (coloração tricrómica de Masson)



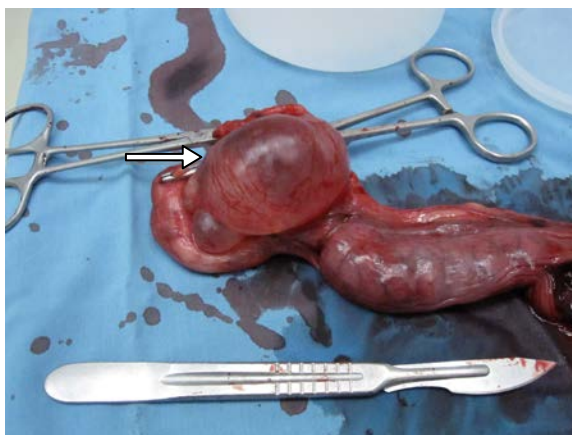
Legenda: Ep- Epitélio pavimentoso, GB- glândulas basais com neutrófilos (Nt) no interior, Est- estroma com infiltração de células de reacção inflamatória.

Tabela 4- Classificação de Dow dos estadios de hiperplasia quística do endométrio em cadelas (adaptado de Bigliardi, 2004 e Payan Carreira & Pires, 2005)

Estadio	Aspecto macroscópico do endométrio	Conteúdo intra-uterino	Lesões Histológicas
I	Espessado, presença de quistos irregulares, focais ou difusos	Não	Hiperplasia endometrial sem endometrite. Hiperplasia glandular irregular intercalada com glândulas normais
II	Semelhante ao anterior, ligeiras alterações de coloração do endométrio e conteúdo dos quistos	Raramente	Endométrio hiperplásico com quistos irregulares. Infiltração por macrófagos, plasmócitos e linfócitos.
III	Espessado, com zonas de hipertrofia exuberante, aspecto rugoso, por vezes com erosões/úlceras e hemorragias focais.	Mucoso	Quistos superficiais endometriais com morfologia e distribuição irregulares e ulceração endometrial. Presença de neutrófilos.
IV-cérvis aberto	Endométrio muito espessado	Sim (purulento)	Endométrio e miométrio fibrosados, quistos de grande dimensão, por vezes roturados. Infiltrado inflamatório.
IV- cérvis fechado	Menos espessado, útero distendido e com paredes finas. Presença frequente de úlceras por vezes profundas	Sim (purulento)	Miométrio atrofiado, endométrio com quistos, ulceração e necrose, por vezes também com atrofia.

Estudos iniciais postulavam que a HQE poderia estar associada a disfunção ovárica associada à presença de quistos (Dow, 1958). No estudo de Dow, cerca de 2% dos ovários possuíam quistos luteínicos de 1,5 a 3 cm de diâmetro. Os quistos luteínicos podem ocorrer associados à HQE ou à piómetra, ou podem ser assintomáticos e serem achados acidentais durante ovariohisterectomia (OVH) de rotina ou laparotomia (Stone, 2003) (figura 11).

Figura 11 - Aspecto macroscópico de quistos ováricos, numa cadela sem sintomatologia clínica evidente.



Legenda: Quisto ovárico de grande dimensão (seta)

Na cadela, no início do desenvolvimento da HQE, as glândulas que estão mais próximas do lúmen uterino são as primeiras a ser afectadas. No entanto, as glândulas hiperplásicas podem estender-se ao miométrio (adenomiose) e mesmo à serosa (endometriose). Quando a HQE é acompanhada por inflamação, a condição é chamada HQE-endometrite (Kooistra et al., 1997). A endometrite/piómetra tratar-se-á de uma reacção inflamatória resultante da infecção uterina (De Bosschere et al., 2001).

As situações de mucómetra, hematómetra ou hidrómetra podem ocorrer em associação com a HQE, distinguindo-se da piómetra por o fluido intrauterino ser geralmente estéril, variando respectivamente, entre mucoso, sanguinolento e seroso (De Bosschere et al., 2001; Pretzer, 2008).

Nomura e Funahashi (1999) descreveram uma forma diferenciada de HQE que designaram por decíduoma, ou hiperplasia endometrial pseudoplacentária, como foi designado também por Schlafer e Gifford (2008). Consiste numa resposta do endométrio a estímulos durante a fase lútea do ciclo mas com uma remodelação proliferativa do endométrio altamente organizada, histologicamente semelhante às zonas placentárias de uma gestação normal.

Bigliardi e colaboradores (2004) verificaram que os úteros que tinham alterações ecográficas compatíveis com os estadios I e II de Dow (1958), histologicamente tinham maior tendência para apresentar um endométrio hiperplásico do que quístico em natureza, o que corresponderia a uma mucómetra, segundo a classificação de De Bosschere et al. (2001) (Tabela 5). A diferença entre o estadio I e o II baseava-se na presença de infiltração plamocitária no estadio II.

A piómetra poderá ser também classificada como aberta ou fechada, em relação à patência do cérvix. Esta afecção é uma urgência médica e cirúrgica devido à grande probabilidade de desenvolvimento de sépsis por endotoxémia e consequente morte do paciente (Pretzer,

2008). Factores que afectam a patência do cérvix nas cadelas com piómetra não estão bem definidos. O os cervical encontra-se aberto durante o proestro e estro, e encontra-se fechado durante o diestro em situações não patológicas. A razão pela qual o aumento da pressão intrauterina, causada pela acumulação de conteúdo purulento que se observa nos estadios III e IV do complexo HQE-piómetra, não causar consistentemente dilatação do cérvix ainda não é conhecida. Também não se encontrou correlação entre as alterações histológicas e a patência do cérvix (Jonhston et al., 2001).

No estudo de De Bosschere e colaboradores (2001) a relação endométrio/miométrio nos casos de HQE ligeira, HQE grave, endometrite e piómetra é superior aos casos de cadelas com úteros normais, maioritariamente devido à hiperplasia do endométrio. No entanto, pode haver variação individual. A hiperplasia endometrial resulta maioritariamente da deformação quística das glândulas nos casos de HQE e da deformação quística das glândulas, proliferação de fibroblastos no estroma, e reacção inflamatória nos casos de endometrite/piómetra. Nos casos de HQE ligeira pode haver dúvidas se a deformação quística do endométrio poderá ser fisiológica ou patológica, mas na endometrite/piómetra os quistos de grande dimensão são sem dúvida patológicos (De Bosschere et al., 2001) (figura 12).

De Bosschere e colaboradores (2001) demonstraram que a HQE nem sempre precede a piómetra. Segundo estes autores trata-se de duas entidades clínicas diferentes, ao possuírem diferenças morfológicas, histológicas e manifestações clínicas igualmente distintas (De Bosschere et al., 2001). A HQE desenvolve-se após vários ciclos éstricos, e não está associada a sinais sistémicos de doença. A piómetra pode desenvolver-se em animais jovens, sem história ou evidência patológica de HQE. Portanto todos os cães desenvolvem HQE com a idade, enquanto que só alguns desenvolvem piómetra (De Bosshere et al., 2003).

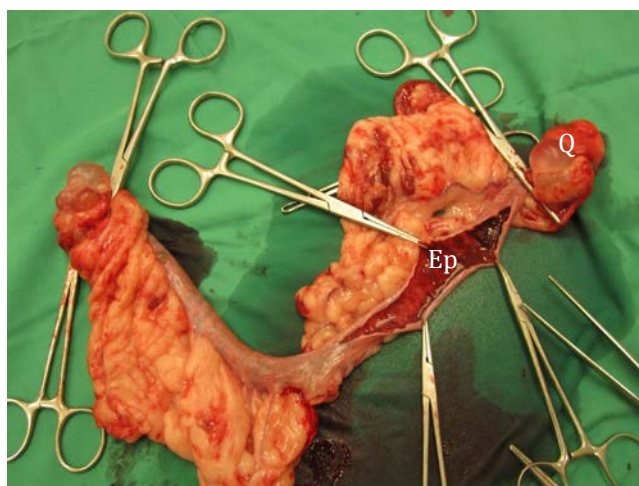
De Bosschere sugeriu também que embora a HQE-mucómetra e endometrite-piómetra possam ser duas entidades separadas, não pode ser excluído que as cadelas com HQE-mucómetra (figura 12) possam estar predispostas a endometrite-piómetra. (De Bosschere et al., 2001).

A tabela seguinte resume a classificação de HQE proposta por De Bosschere e colaboradores (2001, 2003).

Tabela 5 - Classificação histomorfológica de HQE de De Bosschere (adaptado de Bigliardi, 2004)

Grupo	Reacção inflamatória	Área endométrio(%)	Histologia dos quistos	Relação endométrio/ miométrio	Proliferação dos fibroblastos
Normal	Negativa	<25	Sem quistos	Valor referência (0.78)	Negativa
HQE ligeira	Negativa	<25	Poucos/pequenos quistos	Aumentado	Negativa
HQE grave	Negativa	>25	Vários/grandes quistos	Aumentado	Negativa
Mucómetra	Negativa	<10	Sem quistos	Muito diminuído	Negativa
Endometrite	Ligeira	<25	Sem/poucos quistos	Aumentado	Ligeira
Piômetra hiperplásica	Grave	>25	Vários/grandes quistos	Aumentado	Moderada
Piômetra atrófica	Grave	<10	Sem quistos	Muito diminuído	Negativa

Figura 12 - Aspecto macroscópico de útero com mucómetra e hiperplasia quística ligeira, associada a quistos ováricos bilaterais



Legenda: Q- Quisto ovárico, lúmen uterino (Ep), com conteúdo mucoso.

3.2. Prevalência

A HQE nos estadios I e II foi diagnosticada maioritariamente em cadelas com uma idade média de 7,2 anos (Dow, 1958).

Niskanen e Thrusfield (1998) realizaram um estudo epidemiológico envolvendo 953 cadelas com HQE/piômetra e concluíram que a idade média na altura do diagnóstico foi de 8,5 anos (com um intervalo de 9 meses a 18 anos). Também determinaram uma maior prevalência da afecção em cerca de 17 raças (como Golden Retriever, Schnauzer miniatura, São Bernardo, etc) e uma menor prevalência em Daschunds e cadelas de raça indeterminada.

No estudo de Johnston et al. (2001), em 216 cadelas com idade igual ou superior a 9 anos e história de ciclos éstricos normais, cerca de dois terços apresentava HQE. No entanto, Payan Carreira e Pires (2005) fizeram um estudo semelhante, desta vez incidindo sobre 400 cadelas submetidas a OVH, e observaram que apenas ¼ dos casos apresentava HQE. Este estudo difere do anterior devido a abranger um intervalo etário maior.

Vários outros estudos também incidiram sobre a prevalência de HQE e piómetra nas diferentes raças mas as opiniões divergem (Pretzer, 2008). Também não parece haver relação entre pseudo-gestação e piómetra (Pretzer, 2008, citando Fidler et al., 1966).

Poppl (2008) observou que os animais obesos estariam mais predispostos a piómetra devido a uma maior conversão de hormonas esteroides sexuais pelo tecido adiposo, e um estado pró-inflamatório encontrado em pacientes obesos, decorrente das várias citocinas (interleucina (IL-1, IL-6, TNF- α) produzidas pelos adipócitos.

3.3. Etiologia

3.3.1. Alterações das concentrações de progesterona e estrogénios

Uma das primeiras induções experimentais de piómetra associada a HQE foi conseguida através da administração de doses repetidas de concentrações elevadas de progesterona com ou sem administração prévia de estrogénios (Dow, 1959).

A fase lútea do ciclo éstrico das cadelas difere dos restantes mamíferos porque é caracterizada por um aumento prolongado das concentrações plasmáticas de progesterona, independentemente da gestação (Kooistra et al., 1997). A progesterona aumenta a atividade secretora das glândulas endometriais, aumenta a proliferação das células do endométrio, diminui ou inibe a contractilidade do miométrio e causa e mantém o encerramento do cérvix (Hardy & Osborne, 1974; Noakes et al., 2001). A exposição repetida a progesterona endógena durante as várias fases lúteas pode levar a alterações características da HQE (Kooistra et al., 1997). Por essa razão, a HQE seja mais prevalente em cadelas de meia-idade a idade avançada.

Num projecto realizado por Janssens e Janssens (1991), 72 cadelas foram submetidas a ovariectomia e acompanhadas durante 10 anos, comprovando-se a influência da progesterona produzida pelo ovário na patogenia da HQE, não tendo sido esta diagnosticada em nenhuma das cadelas em estudo.

Os estrogénios produzem crescimento, vascularização e edema do endométrio, relaxamento cervical e dilatação, migração de polimorfonuclear neutrófilos para o lúmen uterino. A estimulação de estrogénios previamente à dominância da progesterona é também uma componente da patogenia da HQE, embora a exposição experimental do endométrio a estrogénios por si só não tenha causado alterações patológicas específicas (Dow, 1958; Niskanen e Thrusfield, 1998).

A HQE é frequentemente vista em cadelas tratadas repetidamente com progestagénios com o objectivo de prevenção do aparecimento do estro (Kooistra et al., 1997).

A exposição experimental a progestagénios, incluindo o acetato de megestrol e a medroxiprogesterona, levou à proliferação do epitélio luminal e ao aumento da atividade secretora das glândulas do endométrio (Dhaliwal et al., 1999), predispondo a HQE/piómetra (Arora et al., 2006; Chen et al. 2006). A duração do efeito nocivo dos progestagénios sobre o endométrio está correlacionado com a dose e duração do tratamento (Niskanen e Thrusfield, 1998; De Bosschere et al. 2002b). O efeito dos progestagénios é potenciado pela sensibilização prévia do endométrio por estrogénios, especialmente se ambos forem administrados de forma cíclica, mimetizando o ciclo éstrico normal da cadela.

No estudo de De Bosschere e colaboradores (2001) não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos hormonais e nas alterações patológicas no endométrio entre cadelas tratadas ou não com progestagénios.

Outros factores podem ter um papel na manutenção da HQE, pois foi verificado que em alguns casos, a eliminação da influência da progesterona não eliminava o problema (Chen et al., 2006).

Num estudo com 953 cadelas (Niskanen & Thrusfield, 1998), a administração de estrogénios (benzoato de estradiol) provocou um aumento do risco de piómetra nas cadelas com idade inferior a 4 anos. Niskanen e Thrusfield (1998) afirmam que a razão para este risco aumentado é incerta, mas poderá dever-se à interação entre a idade, terapêutica estrogénica e à expressão dos receptores de estrógeno no útero. Em contraste, neste mesmo estudo, o risco mínimo de piómetra foi associado à administração de acetato de medroxiprogesterona nas doses terapêuticas recomendadas (dose única de 2 a 5mg/kg). No entanto, doses mais altas podem aumentar o risco de piómetra.

3.3.2. Influência de irritantes uterinos

Na fase lútea, especialmente durante os primeiros 30 dias do diestro, o endométrio da cadela está mais sensível a estímulos. Diversos estudos foram realizados no sentido de induzir hiperplasia quística do endométrio-piómetra, e incluíram desde a inoculação de bactérias (*E. Coli*) (Nomura, 1983), até à colocação de suturas no lúmen (Nomura, 1994) ou escarificação do endométrio (Nomura et al. 1990; Dhaliwal et al., 2002). Verificou-se que a inoculação de bactérias podia induzir piómetra sem HQE (Nomura, 1983), mas que os irritantes mecânicos durante o início de diestro causavam apenas HQE sem inflamação (Nomura, 1994, 1996; Dhaliwal et al., 2002).

Num estudo de Chu e colaboradores (2001b), uma sutura foi colocada no lúmen uterino de cadelas ovariectomizadas, quatro delas foram tratadas com estradiol benzoato e acetato de megestrol, enquanto que duas não receberam tratamento. Das quatro tratadas, duas desenvolveram hiperplasia quística do endométrio, enquanto outras duas desenvolveram

HQE e piómetra. Chu e colaboradores (2001b) referem que este tipo de modelo pode ser usado para estudos futuros sobre os mecanismos de degenerescência endometrial e sobre a patogenia da HQE. Estes estudos são compatíveis com a hipótese de De Bosschere e colaboradores (2001) de que a HQE e a piómetra sejam duas entidades separadas.

Verificou-se igualmente que as alterações hiperplásicas de HQE induzidas por estes métodos eram reversíveis, quando se retirava também a estimulação progestagénica. (Hadley, 1975; Nomura, 1983, 1997; Nomura et al., 1990; Nomura & Nishida, 1998; Chen et al., 2001, 2006; Dhaliwal et al., 2002; De Bosschere, 2003).

Deve-se igualmente ter em consideração que a HQE causada por irritantes uterinos em modelos experimentais pode diferir bastante da que ocorre naturalmente, uma vez que embora possam partilhar características histológicas comuns, têm expressões de receptores endometriais distintas (De Cock et al., 1997b; Dhaliwal et al., 1999a e 1999b, 2002; De Bosschere et al., 2002b; Chen et al., 2006)

3.3.3. Infecção bacteriana

Foi sugerido recentemente que, numa fase inicial da HQE, possa existir alguma influência da exposição a pequenas concentrações de bactérias que contaminam o útero durante o estro, na proliferação celular no endométrio. (Nomura & Funahashi, 1999; Noakes et al., 2001; Arora et al., 2006; Chen et al., 2006; Schlafer et al., 2008).

A diminuição da imunidade celular ao nível do útero resulta de um aumento da concentração de progesterona no início da fase lútea. Tsumagari e colaboradores (2005) referem que o útero está mais susceptível à inoculação por *E. coli* entre os dias 11-30 após o pico de LH. A combinação da redução da imunidade, possivelmente por inibição da resposta leucocitária, e a existência de condições uterinas favoráveis para os agentes patogénicos (secreções glandulares aumentadas e atividade miométrica diminuída, especialmente na HQE) torna a colonização bacteriana mais provável durante esta fase (Sugiura et al., 2004). Também é descrita a hipótese de ocorrer um aumento da capacidade de adesão de *E. Coli* às células uterinas (Stone, E. in Slatter, 1998).

Os mecanismos de defesa do útero podem ser inatos ou adquiridos. Os inatos compreendem os receptores de reconhecimento padrões Toll (Toll-like receptores ou TLRs). Estes receptores reconhecem padrões moleculares conservados (PAMP) sintetizados pelos microorganismos, dando origem a uma cascata de eventos que incluem a resposta inflamatória primária (Silva et al., 2010).

A bactéria mais frequentemente encontrada nas piómetras é a *Escherichia coli*, podendo encontrar-se igualmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp, que também fazem parte da flora comensal das cadelas sem patologia (Watts et al., 1995, Dhaliwal et al., 1998). *E. coli* liga-se especificamente a receptores no endométrio que são estimulados pela progesterona através de adesinas de diferentes tipos.

(Verstegen et al., 2008 citando Arora, 2007). Muitos dos sinais clínicos das piómetras, especialmente os ligados a alterações da função renal, são devidos à absorção de toxinas bacterianas, nomeadamente os lipopolissacarídeos de *E. coli*. A presença do factor de necrose citotóxico (CNF-1), ao estar associado a grande perda de integridade epitelial, causa uma reacção inflamatória mais exacerbada (Dhaliwal et al., 1998; Noakes et al., 2001). Noakes e colaboradores (2001) citam um estudo de Wadas e colaboradores (1996) onde é referido que a *E. Coli* isolada em casos de piómetra provém da ampola rectal e que quando existe a infecção concomitante do trato urinário, a mesma estirpe é isolada na bexiga. O que não é ainda claro é se a infecção urinária antecede a infecção uterina ou o inverso (Noakes et al., 2001).

3.3.4. Receptores de progesterona e estrogénio

A expressão ou distribuição dos receptores de estrogénio (RE) e progesterona (RP) nos tecidos alvo é influenciada pelas respectivas hormonas. Do mesmo modo, o efeito da progesterona e do estrogénio é influenciado pelos seus receptores nas células (Noakes et al., 2001). Os estrogénios induzem o aumento do número de receptores de progesterona no endométrio, amplificando o efeito da progesterona. Estudos imunohistoquímicos revelaram que a expressão dos RE nas células epiteliais luminais e glandulares, estroma e miométrio está aumentada durante o proestro e estro e diminuída durante o diestro (Dhaliwal et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados para os receptores de progesterona, excepto para o epitélio glandular no qual há expressão dos RP durante o diestro, mas não no proestro e estro (Dhaliwal et al., 1997). De Cock e colaboradores (1997a) obtiveram resultados semelhantes para os RE. Durante o anestro a expressão dos receptores de estrogénio é baixa. Nas cadelas ovariectomizadas a expressão dos receptores de estrogénio e progesterona é muito baixa ou mesmo indetectável.

A progesterona e estrogénio exógenos também influenciam a expressão dos RP e RE (Dhaliwal et al., 1999; De Bosschere et al., 2002b).

No estudo de De Bosschere e colaboradores (2002b) houve uma diminuição de ambos os receptores após 12 semanas de administração de progesterona, acompanhada por uma atrofia do endométrio e hipertrofia do miométrio. No entanto, após 24 semanas de tratamento, a espessura do miométrio voltou ao normal mas o endométrio encontrava-se espessado e com as glândulas endometriais quísticas. Essa alteração foi acompanhada de um retorno à expressão normal dos receptores de estrogénio e progesterona, na maior parte dos tipos celulares, excepto para o epitélio luminal que manteve uma expressão baixa dos RP e RE e para o epitélio glandular cuja expressão dos RE e RP foi superior. Estes resultados demonstram que os receptores hormonais, especialmente nas células glandulares e do estroma, escapam à diminuição causada pela influência da progesterona no decurso de um tratamento prolongado com esta (De Bosschere et al., 2002b).

Nas cadelas sem HQE, há uma diminuição do número de RE com o aumento da concentração de progesterona (Vermeirsch et al., 1999). Este mecanismo parece estar diminuído ou ausente nas cadelas com HQE, causando um prolongamento do efeito do estrogénio no endométrio durante a fase lútea. Isto pode resultar numa proliferação continuada das glândulas do endométrio durante as fases do ciclo onde existe uma forte influência de progesterona (De Cock et al., 1997b). No entanto, como já foi referido, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações séricas de progesterona e estrogénios entre cadelas com HQE, piómetra (mesmo com corpo lúteo persistente) e cadelas normais na mesma fase do ciclo éstrico (Hardy & Osborne, 1974, Johnston et al., 2001). A explicação sugerida por De Cock e colaboradores (1997a) para uma diminuição dos RE nas glândulas quísticas consiste na degenerescência causada pela acumulação de fluido e compressão do epitélio resultando numa atividade metabólica diminuída.

A expressão dos receptores de estrogénio e progesterona está aumentada no útero de cadelas com HQE (De Cock 1997b; De Bosschere e colaboradores, 2002c e 2003), mas o mesmo não se verifica nos casos de piómetra, cuja expressão dos RE é mais baixa e de RP mais elevada, comparativamente ao que é observado nos úteros saudáveis.

Dhaliwal e colaboradores (2002) experimentaram induzir alterações uterinas por escarificação do útero e verificaram que apenas a expressão de RP no epitélio glandular basal estava aumentado e portanto o trauma poderia modificar a estrutura do endométrio e as características dos RP.

Embora a HQE seja histologicamente semelhante ao início da formação da placenta (Nomura, 1994), imunohistologicamente a expressão dos RE e RP na HQE não corresponde às do útero gestacional descrito por Vermeirsch e colaboradores (2000).

Portanto as alterações nas concentrações dos receptores das hormonas sexuais podem pelo menos aumentar a susceptibilidade do útero à HQE (De Cock et al., 1997b), mas poderão não ser suficientes para explicar todo o processo de desenvolvimento de HQE. Foi sugerido que para a HQE de ocorrência natural ou induzida por progestagénios poderá existir uma via hormono-dependente responsável, enquanto que na piómetra o estímulo poderá ser a infecção bacteriana, que induz uma cascata de eventos semelhante ao início de gestação. Este estudo comprova também a teoria que HQE e piómetra devem ser distinguidas como duas entidades separadas (De Bosschere et al., 2002a).

Os fibroblastos do estroma também foram indicados como podendo desempenhar um papel importante na patogenia da endometrite/piómetra baseados no seu padrão de distribuição de receptores hormonais (Vermeirsch et al., 1999).

3.3.5. Factores de crescimento

Vários factores de crescimento, bem como os seus receptores e proteínas reguladoras têm sido identificados, tendo sido estudadas a sua localização nas células e a dependência

esteroide das suas proteínas (Kida et al., 2010).

A administração de progestagénios pode levar a um aumento da hormona de crescimento (GH) em circulação. O fenómeno não parece estar confinado apenas aos progestagénios pois um aumento de GH foi também observado em cadelas durante a fase lútea do ciclo éstrico. Em cadelas com um excesso de GH induzido pelos progestagénios, a secreção de GH não é estimulada nem inibida pelas neuro-hormonas reguladoras, a GHRH e a somatostatina, respectivamente, indicando secreção autónoma (Rijnberk & Mol, 1997, Bhatti et al., 2007). No entanto, esta produção excessiva é reversível.

Devido às semelhanças das alterações epiteliais induzidas por progestagénios na glândula mamária e útero colocou-se a hipótese de a GH também estar envolvida na HQE induzida por progestagénios. Embora a GH tenha sido encontrada nas células epiteliais uterinas de cadelas tratadas com progestagénios, a ausência de transcrição de GH no tecido uterino, indicou que esta GH não se originou no útero. Este achado refutou a hipótese do envolvimento da produção local de GH na patogenia da HQE (Kooistra et al., 1997).

No entanto, estes achados não excluem a possibilidade da GH desempenhar um papel na patogenia da HQE induzida pelos progestagénios. Nos estudos em ratos é conhecido que GH aumenta a síntese de ARN uterino e o peso uterino. A adição de estradiol terá sido sinérgica neste aumento. É possível que os progestagénios promovam a expressão de receptores de GH nas células epiteliais uterinas. Em combinação com o aumento da GH circulante proveniente da glândula mamária, isto pode explicar a presença de GH nas células epiteliais uterinas. A transcrição do receptor de GH já foi demonstrado no útero humano. GH pode portanto ter também algum efeito na proliferação das células do epitélio uterino, embora, contrariamente à glândula mamária, não pela produção local de GH (Kooistra et al., 1997). O canídeo é a única espécie na qual foi demonstrada que a GH produzida na glândula mamária atinge a circulação sistémica e é biologicamente activa (Bhatti et al., 2007)

Para além das transformações hiperplásicas do endométrio, associadas a HQE-piometra, o aumento da libertação de GH pelo tecido mamário é também um importante factor de resistência à insulina (Poppl, 2008 citando Rijnberk et al., 2003). A resistência à insulina, que pode predispor as cadelas a diabetes melitus, deve-se à redução da ligação da insulina ao seu receptor e o transporte da glucose aos tecidos alvo. A GH reduz a concentração de receptores de insulina e por conseguinte a ligação de glucose nas células alvo. Poppl (2008) demonstrou que um útero com piometra tem mais de sete vezes a probabilidade do desenvolvimento de resistência a insulina que um útero normal na fase de diestro.

A produção local de GH está também associada à produção local (também induzida por progestagénios) de factores de crescimento como o factor de crescimento semelhante à insulina (insulin-like growth factor-IGF) IGF-I e IGF-II, e proteínas de ligação específicas (Rijnberk et al., 1997; Bhatti et al., 2007). IGF pode funcionar em vários tecidos como

inibidor da morte celular programada. O aumento da concentração de proteínas ligadas à IGF (IGFBP-5) pode levar à estimulação do processo apoptótico. GH derivado da glândula mamária não só tem um efeito estimulante no desenvolvimento da glândula mamária mas também estimula a produção local de IGF-I em vários outros órgãos tal como o útero (Mol et al., 1997).

O aumento da concentração de IGF-1, induzido por progestagénios, é considerado como factor potencial envolvido na HQE por se supor ter um efeito mitogénico no útero, estimulando a proliferação do endométrio. A inflamação está associada a factores de crescimento como o IGF-I. No estudo de De Cock e colaboradores (2002) verificou-se que as concentrações de IGF-I encontravam-se mais elevadas nas cadelas com HQE do que em cadelas normais, especialmente no epitélio luminal, glandular e no estroma (na parte mais superficial). A progesterona, quer por tratamento exógeno ou produzida endógenamente durante o ciclo éstrico pode induzir a sobreprodução de GH, que é a principal reguladora de IGF-I circulante. (De Cock et al., 2002). Neste estudo é referido que em associação com o aumento de RE no epitélio glandular e estroma das cadelas com HQE a IGF-1 pode cooperar com os RE na indução da proliferação do endométrio. Estudos *in vitro* demonstram que a IGF-1 pode ser responsável pelo aumento de RE no estroma e células epiteliais do endométrio com HQE. No entanto isto não foi confirmado ainda em estudo *in vivo*. Existe apenas um estudo que refere que o tratamento com IGF-1 em ratos ovariectomizados terá desencadeado hiperplasia endometrial (De Cock et al., 2002).

A estimulação pelas hormonas esteróides do factor de crescimento epitelial (EGF - epithelial growth factor) parece estar envolvido na promoção do crescimento uterino. O EGF e o factor de crescimento tumoral (TGF α - tumour growth factor) estimularam a proliferação de células endometriais nos úteros de ratos (Komatsu et al., 2003 citado por Kida et al., 2010). Kida e colaboradores (2010) sugerem, que nas cadelas, o TGF α esteja envolvido na regulação do crescimento, diferenciação e regressão das células endometriais. TGF α potencia igualmente a reparação de células epiteliais e induz a expressão de péptidos antimicrobianos durante a infecção. Estes são produzidos pelas células epiteliais endometriais e pelos neutrófilos (Kida et al., 2010).

O TGF α produzido pelas células inflamatórias pode contribuir para o crescimento aberrante das glândulas uterinas através de um nível elevado de expressão de EGF-R nas células epiteliais, pressupondo-se que desempenhe um papel no desenvolvimento de HQE (Kida et al., 2010).

Em úteros normais, os níveis de transcrição de TGF α são mais elevados no proestro e gradualmente diminuem à medida que o ciclo progride para anestro. A transcrição dos receptores de EGF não parecem ser afectados significativamente pela fase do ciclo éstrico.

Os níveis de receptores de mRNA de EGF foram mais altos no dia 35 do diestro que nas outras fases do ciclo éstrico. O EGF poderá regular a regressão glandular ao nível do endométrio. No útero humano, o EGF potencia a susceptibilidade à apoptose do epitélio endometria glandular do meio para o final da fase secretora. Portanto, talvez a regressão do útero canino durante o meio do diestro seja causada por apoptose induzida pelo EGF (Kida et al., 2010).

Nas cadelas com piómetra, os níveis de transcrição de TGF α e do receptor para o EGF-R não parecem diferir significativamente dos mesmos no diestro de uma cadela normal. No entanto, os níveis de transcrição de EGF foram mais baixos quando comparados com os níveis observados no dia 35 do diestro em úteros de cadelas normais. As mudanças morfológicas nas glândulas uterinas induzidas pelo TGF α podem resultar na perda de expressão de EGF nas células epiteliais e consequentemente na incapacidade de travar o crescimento das glândulas. Talvez o reduzido nível de expressão de EGF no endométrio resulte numa regressão anormal das glândulas uterinas. O mecanismo responsável pela expressão reduzida de EGF no endométrio nas cadelas com piómetra não é conhecido (Kida et al., 2010).

Nas cadelas com piómetra, a imunoreactividade de EGF está claramente presente nas células do estroma. As células inflamatórias que infiltram o estroma endometrial marcam fortemente para o TGF α e para o receptor do EGF, o que não acontece num útero normal. A contaminação bacteriana ou outros estímulos poderá resultar no aumento da expressão de TGF α nas células inflamatórias e talvez no aumento da expressão de EGF nas células do estroma e no desenvolvimento de HQE. Portanto, algumas estimulações mecânicas, incluindo as bactérias, podem causar alterações na expressão de EGF nas células do estroma e assim estarem envolvidas no desenvolvimento de hiperplasia quística do endométrio (Kida et al., 2010).

Silva et al. (2009) demonstraram que a transcrição dos genes *cox-2*, *pge* e *pgf* está aumentada no endométrio de cadelas com piómetra por *E. coli*. Também a expressão da cicloxigenase (COX-2) está aumentada especialmente no epitélio glandular e luminal e nas células inflamatórias (Silva et al., 2009). Estes autores demonstraram igualmente que a transcrição e a expressão dos TLR2 e TLR4 estão aumentadas nos casos de piómetra, possivelmente devido a acção dos lipopolissacarídeos (LPS) e das lipoproteínas ao nível do epitélio luminal e à grande infiltração de leucócitos, maioritariamente neutrófilos, no endométrio. A activação dos TLRs leva ao aumento da concentração de citocinas, tais como a IL-1, a IL-6 e o TNF α , e ao aumento da concentração de PGE₂ e de PGF_{2 α} . A elevada concentração de PGE₂ poderá contribuir para reforçar a diminuição da imunidade celular observada na piómetra (Silva et al., 2010). As concentrações plasmáticas dos metabolitos da PGF_{2 α} (PGFM) estão significativamente aumentadas nas situações de

piómetra, comparativamente ao observado nos casos de HQE e nos animais sem afecção. Presume-se que essa diferença se deva à inflamação do útero causada pela infecção bacteriana que vai estimular a secreção das prostaglandinas. Este estudo mostra que é possível distinguir as duas afecções através da quantificação da concentração de PGFM (Hagman et al., 2005).

Um estudo recente de Santos e colaboradores (2012) demonstrou níveis de expressão superior do factor de necrose tumoral (TNF) na maioria das amostras de úteros com HQE, em comparação com os de piómetra, o que poderá estar associado à infiltração inflamatória nas fases II, III e IV de HQE, segundo a classificação de Dow. A imunoreactividade para o TNF foi mais evidente nas fases iniciais de HQE, o que poderá indicar o seu envolvimento na patologia do processo (Santos et al., 2012).

3.4. Diagnóstico

O diagnóstico da HQE e piómetra é indicado pela anamnese (fêmeas de meia idade, inteiras, em diestro) e pelas alterações no exame físico (Mateus & Eilts, 2010). O exame físico em cadelas com HQE não complicada não apresenta alterações na maioria dos casos (Potter et al. 1991). O único sinal que pode levar à suspeita de HQE é a infertilidade, devido às alterações do endométrio (Pretzer, 2008). O útero mesmo quando se encontra ligeiramente hipertrofiado, poderá não ser palpável. Quando muito distendido, poderá tornar-se friável e uma palpação exagerada poderá causar rotura. Nestes casos, mesmo sem ocorrer rotura e peritonite séptica, um dos sintomas evidentes poderá ser dor abdominal. O sinal mais comum nas cadelas com piómetra aberta é um corrimento vulvar fétido sanguinolento a mucopurulento. Poderá, no entanto, não ser evidente o corrimento, no caso de piómetra fechada, ou este ser apenas mucoso ou sanguinolento com odor pouco intenso (Feldman & Nelson, 2004, Verstegen et al., 2008). Este corrimento ocorre fora do estro (Johnston et al., 2001).

Numa fase inicial, as cadelas com piómetra aberta poderão não apresentar mais nenhum sinal para além do corrimento vulvar. Noutros casos pode ocorrer letargia, depressão, anorexia, poliúria e polidipsia (PU/PD), vômito e diarreia (Wheaton et al., 1989). No que diz respeito a cadelas com piómetra fechada, eventualmente verificam-se sinais de doença sistémica, que incluem prostração, letargia, PU/PD, vômito, diarreia, possível distensão abdominal, desidratação, hipertermia. As cadelas poderão mesmo ficar com toxémia e sépsis, e, se não controlada e resolvida a piómetra, entrar em choque e falência sistémica (Dow, 1958; Hardy & Osborne, 1974, Hagman et al., 2005).

Um método inicial de diagnóstico que distingue piómetra aberta de mucometra, hidrómetra ou hemómetra é a citologia vaginal. A presença de neutrófilos degenerados em grande

quantidade será fortemente indicativa de piómetra. Também se podem observar bactérias intra ou extra-celulares. No caso das mucometras a citologia revela menor quantidade de neutrófilos, com ou sem alterações degenerativas, eritrócitos, células do endométrio, com citoplasma vacuolizado e quantidades variadas de detritos. Nas hidrómetras é comum a presença de células do endométrio em quantidade moderada, escassos eritrócitos e leucócitos e muco e detritos em quantidades mínimas. Nas hemómetras, os eritrócitos são as células predominantes, observando-se igualmente escasso número de leucócitos e células endometriais e quantidade mínima de detritos e muco (Pretzer, 2008).

A nível analítico as HQE com ou sem mucometra, hemometra ou hidrómetra, raramente apresentam alterações significativas no hemograma ou bioquímicas sanguíneas, ou mesmo na urianálise. Em determinadas situações apenas se observa uma anemia regenerativa ligeira (Pretzer, 2008). No caso das piómetras, as alterações podem ser várias, como a leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda (especialmente nas piómetras fechadas), monocitose, anemia normocrômica e normocítica, azotémia, hiperglobulinémia, hipoalbumémia e acidose metabólica. O parâmetro bioquímico sanguíneo mais frequentemente aumentado é a fosfatase alcalina sérica, presente em cerca de 50 a 75% dos casos. Ocasionalmente a alanina transaminase (ALT) poderá estar ligeiramente aumentada. Isto deve-se a lesões hepato-celulares causados pela toxemia ou diminuição da circulação hepática causada por desidratação (Verstegen et al., 2008).

A nível de urianálise poderão observar-se diferenças na densidade urinária, devido a desidratação ou a PU/PD. A diminuição da densidade urinária pode dever-se à diminuição da capacidade de concentração da urina pelos efeitos das endotoxinas no rim. Também se observa ocasionalmente proteinúria (Hardy & Osborne, 1974).

Nas classificações de De Bosschere e colaboradores (2001) existe uma correlação entre a presença de sintomatologia clínica e a reacção inflamatória observada no útero, concluindo que a endometrite-piómetra é obviamente uma doença clínica, ao contrário da HQE-mucómetra.

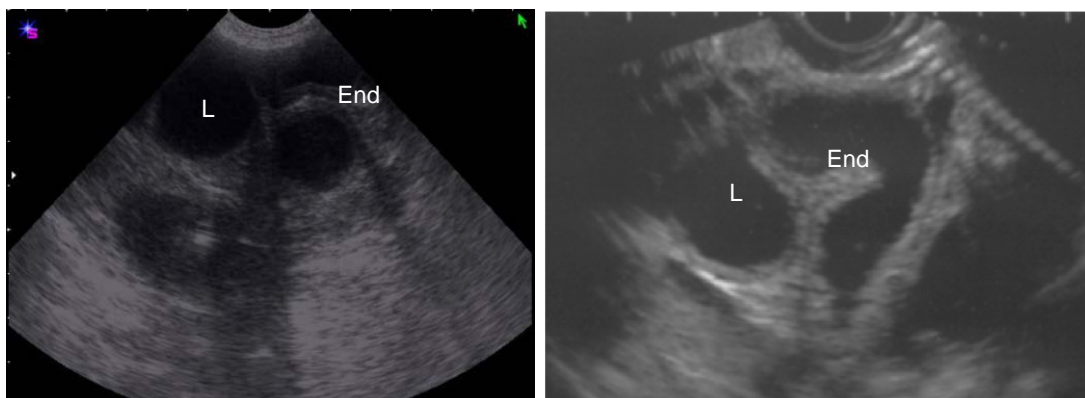
Outro método de diagnóstico e de prognóstico que pode ajudar a distinguir HQE de piómetra é a quantificação de proteína C reactiva por se tratar de uma proteína inflamatória de fase aguda. Esta quantificação permite uma sensibilidade de 97% na distinção das duas afeções, quando associada ao quadro clínico e ao hemograma com presença de neutrofilia com desvio à esquerda (Poppl, 2008 citando Fransson, 2004).

O exame ecográfico é um método eficaz e fiável para detectar alterações patológicas no útero. Permite avaliar a integridade da parede uterina, o espessamento da parede uterina, a distensão do útero, a presença de glândulas quísticas e a presença de conteúdo intra-uterino. No estudo de Bigliardi e colaboradores (2004) verificou-se que o diagnóstico

ecográfico de HQE consegue ser correcto na maioria dos casos, com estreita correlação com a classificação de Dow, nos estadios III e IV. É também eficaz em classificar mucometra, endometrite, piómetra hiperplásica e piómetra atrófica, segundo a classificação de De Bosschere e colaboradores (2001), distinguindo-as de gestação normal. No entanto não é tão eficaz a distinguir HQE de grau I e II, segundo a classificação de Dow (1958).

Os achados ultrassonográficos incluem um útero aumentado, tubular com conteúdo anecoico a hipoeicoico (Voges et al., 1996) (figura 13). O conteúdo uterino é em geral homogéneo mas pode apresentar-se mais ecodenso com padrões mais heterogéneos. Na HQE, com ou sem piómetra, o endométrio poderá apresentar-se espessado, irregular e quístico, e até mesmo aspecto edemaciado. Nas piómetra abertas e HQE de grau IV hipertrófico, para além do descrito, o conteúdo intra-uterino mucopurulento pode observar-se como um padrão hipoeogénico irregular, por vezes com partículas em suspensão. Nas piómetras fechadas e HQE IV atrófica, o endométrio apresenta-se fino e por vezes há perda de nitidez nas camadas da parede do útero, que se encontra com um diâmetro muito aumentado. O conteúdo intra-uterino apresenta-se igualmente hipoeogénico com partículas hiperecogénicas (Payan Carreira & Pires, 2005).

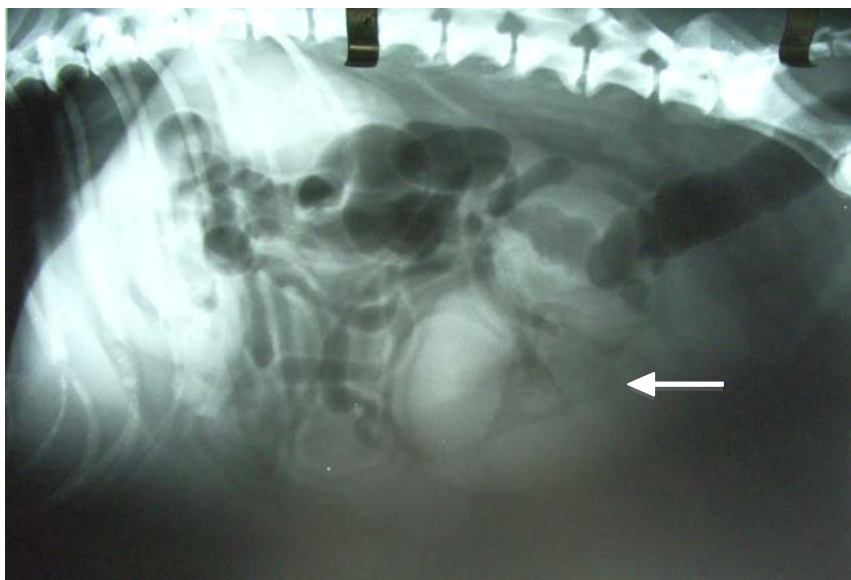
Figura 13 -Ecogramas de útero com piómetra numa cadela



Legenda: Útero com lúmen (L) distendido e conteúdo hipoeogénico, endométrio (end) espessado (imagens cedidas por Luisa Mateus)

Radiograficamente, as alterações uterinas podem ser difíceis de distinguir e portanto a radiografia pode não ser conclusiva. A imagem radiográfica de piómetra, mucometra ou torção uterina poderá não se diferenciar de um útero no início de gestação. Esta última só é conclusiva após mineralização fetal, que ocorre em média cerca de 45 dias após a ovulação (Pretzer, 2008). Nas piómetra, o útero evidencia-se radiograficamente como uma estrutura tubular de contornos tortuosos, no abdómen caudal e médio, entre a bexiga e o cólon. Em alguns casos poderá deslocar mesmo o cólon dorsalmente e o intestino delgado cranial e dorsalmente (figura 14). Observa-se uma opacidade de tecidos moles ou fluidos (Payan Carreira & Pires, 2005).

Figura 14 - Imagem radiográfica de piómetra numa cadela



Legenda- Útero distendido, de aspecto tortuoso, no abdómen caudal (seta). (Imagem cedida pelo departamento de imagiologia do HE-FMV)

3.5. Tratamento

A gravidade das alterações uterinas deverá ser avaliada antes de se decidir o protocolo terapêutico mais adequado. Apesar da HQE não poder ser, até onde se conhece, revertida com as terapêuticas médicas atuais, o facto desta afecção ser predisponente da piómetra, faz dela um factor de risco que deve ser vigiado ou controlado. Uma HQE marcada ou a presença de quistos ováricos concomitantemente, pode afectar o sucesso terapêutico e aumentar a probabilidade de recidivas (Bigliardi et al., 2004, Fayer-Hosken et al., 1992). Se o tratamento médico não for bem sucedido, se a piómetra recidivar ou se a cadela em questão não for para reprodução, o tratamento cirúrgico deverá ser recomendado (Payan Carreira et al., 2005; Mateus & Eilts, 2010). Os animais que requerem tratamentos longos e repetidos têm um bom prognóstico em termos de recuperação física mas um prognóstico reservado em termos de fertilidade (Mateus & Eilts, 2010).

Após o tratamento médico inicial, uma zaragatoa vaginal deverá ser efectuada e enviada para cultura bacteriana, no ciclo éstrico seguinte, mais precisamente durante o proestro. Se ocorrer crescimento bacteriano, a terapêutica deverá adequar-se ao teste de sensibilidade antibiótica e compreender a duração das fase de proestro e estro, pois são as fases mais vulneráveis à colonização bacteriana ascendente, pelos motivos já referidos anteriormente (Mateus & Eilts, 2010). Vários estudos referem que as cadelas deverão ser reproduzidas no ciclo éstrico imediatamente a seguir ao tratamento médico para prevenção de recidivas, nas cadelas destinadas a reprodução (Gobello, 2006). No entanto a terapêutica deve ser mantida independentemente da cadela ser cruzada ou não (Mateus & Eilts, 2010).

Os objectivos do tratamento das piómetras, independentemente do protocolo, passam por:

- Prevenção dos efeitos da progesterona por indução da luteólise ou prevenção da ligação da progesterona aos seus receptores. A luteólise é promovida directamente pela administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, ou indirectamente com recurso a agonistas da dopamina, através da inibição de prolactina que induz a interrupção funcional e luteólise do CL (Verstegen et al., 2008). A combinação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e dos agonistas da dopamina potencializa os efeitos luteolíticos de cada substância e resulta numa luteólise mais rápida. (Gobello, 2006).

Os efeitos da progesterona também podem ser revertidos prevenindo a ligação desta aos seus receptores por antagonistas competitivos dos receptores de progesterona (aglepristone e mifepristona) (Gobello, 2006; Verstegen et al., 2008). A ausência de estimulação e activação dos receptores mimetiza igualmente os efeitos de luteólise, que por sua vez previne todos os efeitos da progesterona no útero e no sistema imunitário.

- Promoção do relaxamento do cérvix nas piómetras fechadas para permitir a expulsão do conteúdo intra-uterino. Isto é geralmente conseguido pela administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou antagonistas dos receptores de progesterona (Verstegen et al., 2008).
- Indução da contração do miométrio com expulsão dos conteúdos intra-uterinos através da administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Verstegen et al., 2008).
- Inibição do crescimento e desenvolvimento bacteriano através do uso de antibióticos de largo espectro ou específicos. Os antibióticos de largo-espectro descritos como uma boa escolha inicial são a amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas e sulfamidas potenciadas. A escolha final baseia-se nos resultados da cultura bacteriana e teste de sensibilidade antibiótica (Verstegen et al., 2008).
- Facilitar a regeneração uterina em animais com sinais evidentes de degenerescência. Isto é conseguido prolongando o anestro. O prolongamento do anestro permite maior apoptose e regeneração do endométrio, preparando o animal para uma nova gestação. Para se atingir este objectivo é utilizada mibolerona, um agonista dos receptores de androgénios. O ciclo seguinte poderá ser adiado dois a um máximo de três meses, o que prolonga o período de regeneração e facilita a redução de parte das lesões de HQE (Verstegen et al., 2008).

O estudo de Fieni (2006) demonstrou que o uso de aglepristona tem uma óptima eficácia no tratamento de metrites e cerca de $\frac{3}{4}$ das cadelas com piómetra ficaram curadas. Essa proporção aumentou com a associação da administração de aglepristona com o cloprostenol ($\text{PGF}_{2\alpha}$).

Em alguns animais, devido ao aumento da contractilidade do útero, a reabsorção de endotoxinas pode aumentar e a condição do animal deteriorar-se. Deve-se ter em atenção este factor e uma terapêutica agressiva de suporte, com recurso a fluidoterapia, para além

de suporte cardíaco, hepático e renal, deve ser iniciada prontamente e ajustada conforme a evolução clínica. Se ao fim de 2 a 5 dias, o útero não estiver a responder ao tratamento, deverá ser ponderada outra terapêutica médica ou cirúrgica (Verstegen et al., 2008).

A cadela deve ser reavaliada ecograficamente duas semanas após o tratamento com as prostaglandinas (com ou sem agonistas de dopamina ou antagonistas dos receptores de progesterona) e se ainda se observar corrimento vaginal, leucocitose com neutrofilia e hipertermia, recomenda-se o prolongamento da antibioterapia (Verstegen et al., 2008).

Hoje em dia, a percentagem de recidivas está a diminuir, principalmente pela evolução das escolhas e eficácia de novas abordagens terapêuticas. A maior parte dos casos de recidivas ocorre em úteros que já tinham alterações quísticas do endométrio (Verstegen et al., 2008), ou quistos ováricos que produzem um permanente desequilíbrio endócrino (Fieni, 2006). Quando o tratamento e a regeneração uterina são bem sucedidos, a probabilidade da cadela desenvolver piómetra de novo é a mesma de uma cadela da mesma idade mas sem história de afecção uterina. Do mesmo modo, a fertilidade da cadela é melhor, quanto mais rápida for a resposta ao tratamento (Verstegen et al. 2008). Verstegen e colaboradores (2008) recomendam OVH se a resposta não for satisfatória ao fim de cinco dias.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem

Neste estudo foram utilizados vinte e nove úteros de cadelas submetidas a ovariectomia (OVH) electiva, por motivos de contracepção. Durante a consulta recolheram-se os dados de cada animal, no que diz respeito a idade, raça, peso, gestações prévias eaios (frequência, alterações, data do último cio), história clínica prévia e alterações analíticas pré-cirúrgicas.

As OVH foram realizadas no serviço de cirurgia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (pela autora da tese), na Liga Portuguesa dos Direitos do Animais e no Canil Municipal de Sintra.

1.1. Colheita de Amostras

Em cada animal, antes da cirurgia, foi realizada uma zarcato vaginal para citologia e colheita de 3 a 5ml de sangue para um tubo seco para doseamento de progesterona. A partir das zarcatoas vaginais, foram efectuados esfregaços por aposição em lâmina de vidro, que secaram ao ar. Estas citologias foram posteriormente submetidas a coloração com Giemsa (Giemsa stain modified, Accustain®, GS1L-1L, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e montadas com Entellan® (Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).

O sangue colhido para doseamento de progesterona foi centrifugado (10min. x 300g), e o soro armazenado a -20°C em *eppendorfs* até processamento.

As zarcatoas do conteúdo uterino, realizadas posteriormente à OVH, foram processadas no Laboratório de Microbiologia da FMV. As zarcatoas foram inoculadas em dois meios sólidos e um meio líquido, respectivamente, Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (PB5039A, OXOID Deutschland GmbH) (COS), Agar McConkey (610028, Liofilchem Italy), e Brain Heart infusion Broth (BHiB) (610008, Liofilchem Italy). Estes meios de cultura foram incubados durante 24 horas, a 37°C. Como os resultados das culturas foram negativos não foi necessário proceder a métodos de identificação das bactérias.

Imediatamente após a OVH, com recurso a material esterilizado foram colhidas duas amostras de cada corno uterino, uma caudal e outra cranial, e os ovários, que foram colocados em formol tamponado (Formaldeído 4% pH6.9, Merck KGaA, 1.00496.9010, Darmstadt, Alemanha) durante 24 horas. O fragmento a fixar foi colocado num volume de formol 10 vezes superior, aproximadamente (Junqueira & Carneiro, 2005).

Depois do período de fixação, os fragmentos foram processados no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV. Foram cortados e incluídos em parafina, com recurso a um processador de tecidos LEICA TP1020. Seguidamente realizaram-se cortes de 4µm de espessura com um micrótomo. Estes cortes foram submetidos a coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E) (Hematoxylin Solution Gill N°2 Accustain®, GHS280, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA ; Eosin Y Solution Alcoholic with Phloxine, Accustain®, HT110380, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e caracterizados histologicamente.

1.2. Caracterização das amostras

Através da análise da citologia vaginal, doseamento de progesterona sérica, avaliação macroscópica e histológica do útero e ovários, determinou-se a fase do ciclo estrico de cada uma das cadelas e o estadio da HQE.

A análise da citologia vaginal foi realizada com base nas alterações celulares qualitativas e quantitativas da chave celular (tabela 2). O doseamento de progesterona foi efectuado sem extracção de amostra por quimioluminescência (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Lda., Amadora, Portugal) com o kit Immulite 1000 Progesterone Kit, Siemens). O coeficiente de variação inter-ensaio para o controlo CON4 (1,66ng/ml), CON5 (3,8 ng/ml) e CON6 (14,2ng/ml) variou entre 2-4% (Multivalent Control Module, Siemens). Este procedimento decorreu no Laboratório de Endocrinologia da FMV.

A observação macroscópica do útero permitiu identificar alterações quísticas no endométrio, presença de quistos ovários, presença de corrimento intra-luminal e aumento da espessura da parede uterina. Histologicamente, caracterizou-se o epitélio luminal e glandular, a relação entre a área glandular e estroma e o número e morfologia das glândulas, para determinar conjuntamente com os parâmetros anteriores, a fase do ciclo estrico de cada cadela e a presença e grau de hiperplasia quística do endométrio. Como factor de exclusão, retiraram-se todos os úteros onde concomitantemente se confirmou a presença de piómetra ou neoplasias uterinas.

2. Marcação por imunohistoquímica do Ki-67

A proliferação celular foi avaliada por imunohistoquímica após marcação com o anticorpo Ki-67 (Ki-67 Monoclonal Mouse anti-human, clone Mib1, M7240, Dako, Glostrup, Dinamarca), , segundo o protocolo utilizado pelo Laboratório de Reprodução da FMV.

Foram realizados cortes histológicos consecutivos de 4µm dos fragmentos uterinos e colocados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Posteriormente, os cortes foram desparafinados, rehidratados e lavados em água corrente durante 5 minutos.

A detecção imunohistoquímica foi efectuada pelo método da imunoperoxidase. As lâminas foram incubadas numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogénio (Suprapur®, Hydrogen peroxide 30%, Merck KGaA, 1.07298.0250, Darmstadt, Alemanha) em metanol (EMSURE®, Methanol for analysis, Merck KGaA, 1.06009.2511, Darmstadt, Alemanha) durante 30 minutos. Este procedimento destinou-se a bloquear a atividade da peroxidase endógena. Para a recuperação antigénica, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH=6; 0,1M ácido cítrico pH=1,8 e 0,1M citrato de sódio pH=8,8) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foram então submetidas a radiação de microondas durante 15 minutos (700w) e arrefecidas à temperatura ambiente durante 20 minutos. Efectuaram-se lavagens com TBS/0,3% Triton X pH=7.2-7.4 (tampão TBS pH=7,476 – 50mM tris-HCl e 150mM NaCl) durante 5 minutos e as lâminas foram incubadas numa solução bloqueadora (Histostain® - Plus Bulk Kit Zymed® 2nd generation, 85-9043, Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Este último passo destinou-se a bloquear os locais de ligação inespecíficos.

As lâminas foram incubadas a 4°C com o anticorpo primário Ki-67 diluído em TBS (1:100), durante o período da noite. Seguiu-se uma lavagem com TBS e nova incubação durante uma hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (Histostain®-Plus Bulk Kit Zymed® 2nd Generation). Após esta incubação foram novamente lavadas com TBS durante 10 minutos. Foi adicionado o cromagénio DAB (DAB kit, Zytomed Systems, 00-2014, Berlim, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante, para ocorrer a reacção colorimétrica. Foi efectuada nova lavagem com água corrente durante 5 minutos, e coraram-se as lâminas com hematoxilina (Mayers's hemalum solution, 1.09249.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram lavadas novamente com água corrente, desidratadas com concentrações crescentes de etanol até xilol e montadas com Entellan® (Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).

Foram realizados simultaneamente dois controlos negativos, através da substituição do anticorpo primário pelo isotipo correspondente - anticorpo monoclonal Mab IgG1 (Purified mouse IgG1 k isotype control clone MOPC-31C, BD Pharmingen™, 550878, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) em concentração igual ou por TBS.

3. TUNEL

O método de TUNEL foi o escolhido para a detecção da apoptose celular. Foi realizado igualmente no Laboratório de Reprodução da FMV, segundo o protocolo descrito pelo fabricante (ApoptTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Millipore), com as modificações que se seguem.

Realizaram-se cortes histológicos consecutivos de 4µm dos fragmentos uterinos e colocados em lâminas Superfrost® (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha).

Foram seguidamente desparafinados, rehidratados e lavados com água corrente durante 5 minutos.

As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos com uma solução de proteinase K (20µg/ml) (Proteinase K recombinante, PCR grade lyophilized, Roche, 03.115.836.001, Alemanha), e seguidamente lavadas com água destilada duas vezes durante dois minutos. As lâminas foram incubadas numa solução de 3% de peróxido de hidrogénio (Suprapur®, Hydrogen peroxide 30%, Merck KGaA, 1.07298.0250, Darmstadt, Alemanha) durante cinco minutos, seguidas de lavagem com PBS (pH=7,476; 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 2,7mM KCl e 137mM NaCl) 2X5 minutos, e incubação com *Equilibration Buffer* (kit ApoptTag®) durante 10 segundos. Procedeu-se a incubação das lâminas a 37°C em câmara húmida durante 1 hora com a enzima TdY (kit ApoptTag®) e seguidamente, colocação numa solução tampão *Stop/Wash Buffer* (kit ApoptTag®) à temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguiram-se lavagens com PBS 3x1 minutos, e as lâminas foram incubadas com anti-digoxigenina-peroxidase (kit ApoptTag®) durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara húmida. As lâminas foram lavadas 4x2 minutos em PBS. Para ocorrer a reacção colorimétrica foi adicionado o cromagénio DAB (kit ApoptTag®) seguindo as indicações do kit.

Foi efectuada nova lavagem com água corrente durante 5 minutos, e procedeu-se à contrastação das lâminas com hematoxilina (Mayers's hemalum solution, 1.09249.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram lavadas novamente com água corrente, desidratadas com concentrações crescentes de etanol até xilol e montadas com Entellan® (Merck KGaA, 1.07961.0500, Darmstadt, Alemanha).

Como controlos positivos, foram utilizados cortes histológicos de glândula mamária de fêmea de rato, fornecidos pelo kit.

4. Análise quantitativa

Através da análise microscópica (Microscópio Olympus BX51, Japão) por duas observadoras, foram determinados os resultados de apoptose e proliferação celular.

Para cada lâmina foram contabilizadas cerca de 200 células por estrutura histológica com recurso ao programa ImageJ (ImageJ 1.43u, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). As estruturas histológicas foram divididas em epitélio luminal, epitélio das criptas, epitélio das glândulas basais, estroma e vasos sanguíneos, numa ampliação de 400x.

Para a análise de apoptose celular através de TUNEL adoptou-se a classificação por índices de apoptose descritos por Chu *et al.* (2006). Esta classificação compreende cinco níveis de marcação celular (0: sem células positivas; 1: 1-20 células; 2: 21-40 células; 3: 41-60 células e 4: >60 células), em que se considera como marcação positiva as células que apresentam o núcleo de coloração castanha, células com corpos apoptóticos no citoplasma e as que possuem morfologia alterada típica de apoptose. Esta classificação permite reduzir o erro

associado à contagem quando é difícil individualizar as células que se encontram desintegradas.

O índice de proliferação celular foi calculado tendo em conta a percentagem de células com marcação positiva para o Ki-67 em cada um dos compartimentos histológicos. Foi considerada marcação positiva as células com núcleo marcado a castanho.

Foram efectuados estudos comparativos referentes a:

- dados obtidos de proliferação celular e apoptose em endométrios com Hiperplasia Quística com ou sem a presença de quistos foliculares, nas diferentes fases do ciclo éstrico, para as várias estruturas tecidulares, comparando os dados obtidos em úteros sem alteração (Cruz, 2011).
- concentrações séricas de progesterona, quando disponíveis, para as fases estudadas.

5. Análise estatística

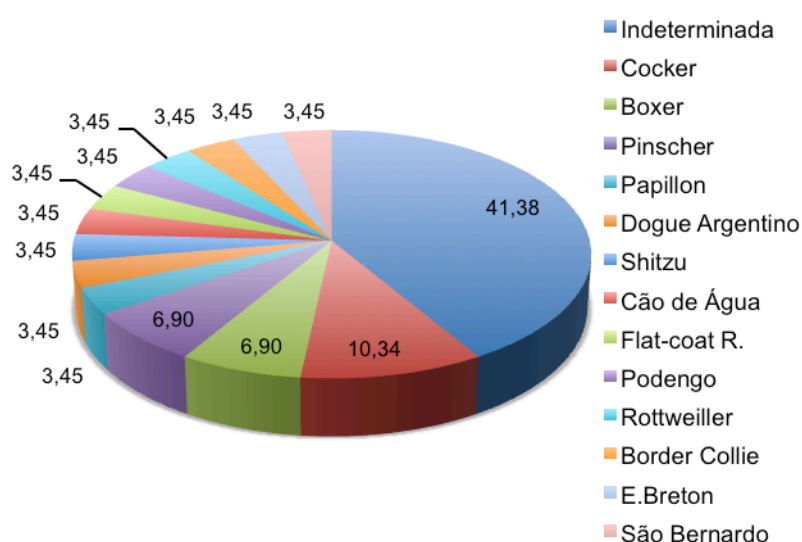
A análise estatística dos dados foi efectuada com recurso ao programa SPSS® (SPSS® Statistics 20, IBM® Corporation, EUA, 2011). Após verificação da normalidade da distribuição da amostra, e não se confirmando esta, fez-se o tratamento dos dados baseado em variáveis independentes e não contínuas, optando-se pelos teste *Mann-Whitney U-test*. O grau de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

IV. RESULTADOS

Neste estudo foram utilizados 29 úteros de cadelas submetidas a OVH, com idades compreendidas entre um e 16 anos, sendo a média de idades de 7,6 anos.

A raça predominante foi a raça indeterminada (41,4%), seguida de Cocker Spaniel (10,3%), Boxer e Pinscher (6,9%) (gráfico 1).

Gráfico 1- Distribuição da incidência de HQE segundo as raças das cadelas incluídas no estudo



Legenda- Os valores apresentados correspondem a percentagem de casos de HQE por raça. Flat-Coat R.- Flat-coat Retriever, E. Breton- Epagneul Breton

Com base na avaliação macroscópica e microscópica dos ovários e útero, concentração sérica de progesterona (quando disponível) e citologia vaginal, podemos observar que 4 (13,8%) cadelas apresentavam estro persistente devido à presença de quistos foliculares, 12 (41,3%) cadelas estavam no fim do diestro e 13 (44,8%) cadelas estavam em diestro, mas o ovário apresentava quistos foliculares simultaneamente com a presença de corpos lúteos (tabela 6). Entre estas, 3 (10,3%) estavam no início do diestro, 6 (20,7%) no meio do diestro e 4 (13,8%) estavam no fim do diestro.

1. Avaliação histológica dos úteros

Em cortes histológicos corados com H&E foi feita a avaliação do grau de HQE de acordo com os critérios de Dow (1958), tendo-se observado que 18 (62,0%) úteros apresentavam HQE de estadio I, 7 (24,1%) úteros apresentavam HQE de estadio II, e 4 (13,8%) não apresentava HQE (tabela 6).

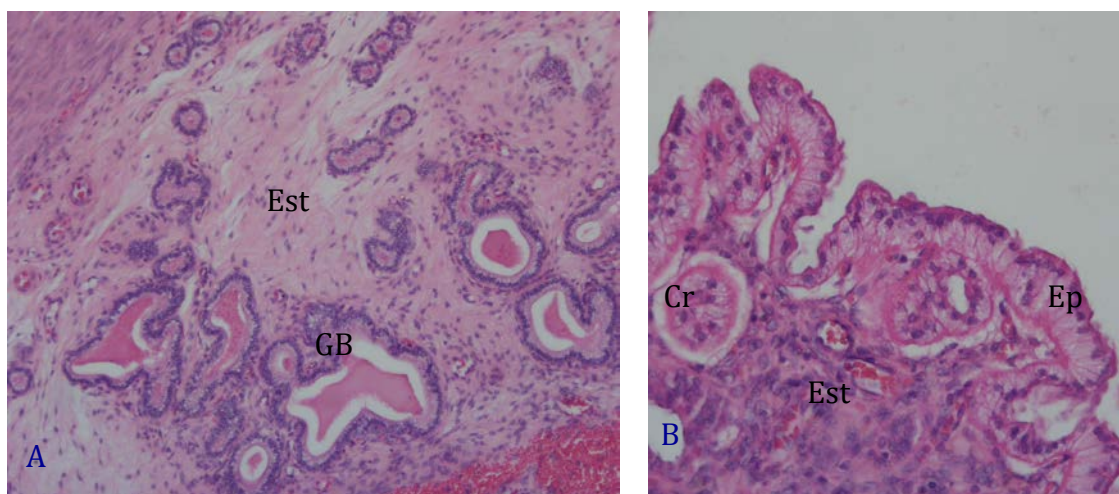
Tabela 6- Avaliação da amostra de acordo com a fase do ciclo e estadio de HQE

	HQE I	HQE II	Sem HQE
Estro persistente associado a quistos foliculares	4	0	0
Fim de diestro	7	5	0
Diestro associado a persistência quistos foliculares	7	2	4

Legenda- HQE I- hiperplasia quística do endométrio no estadio I; HQE II- hiperplasia quística do endométrio no estadio II, segundo a classificação de Dow (1958)

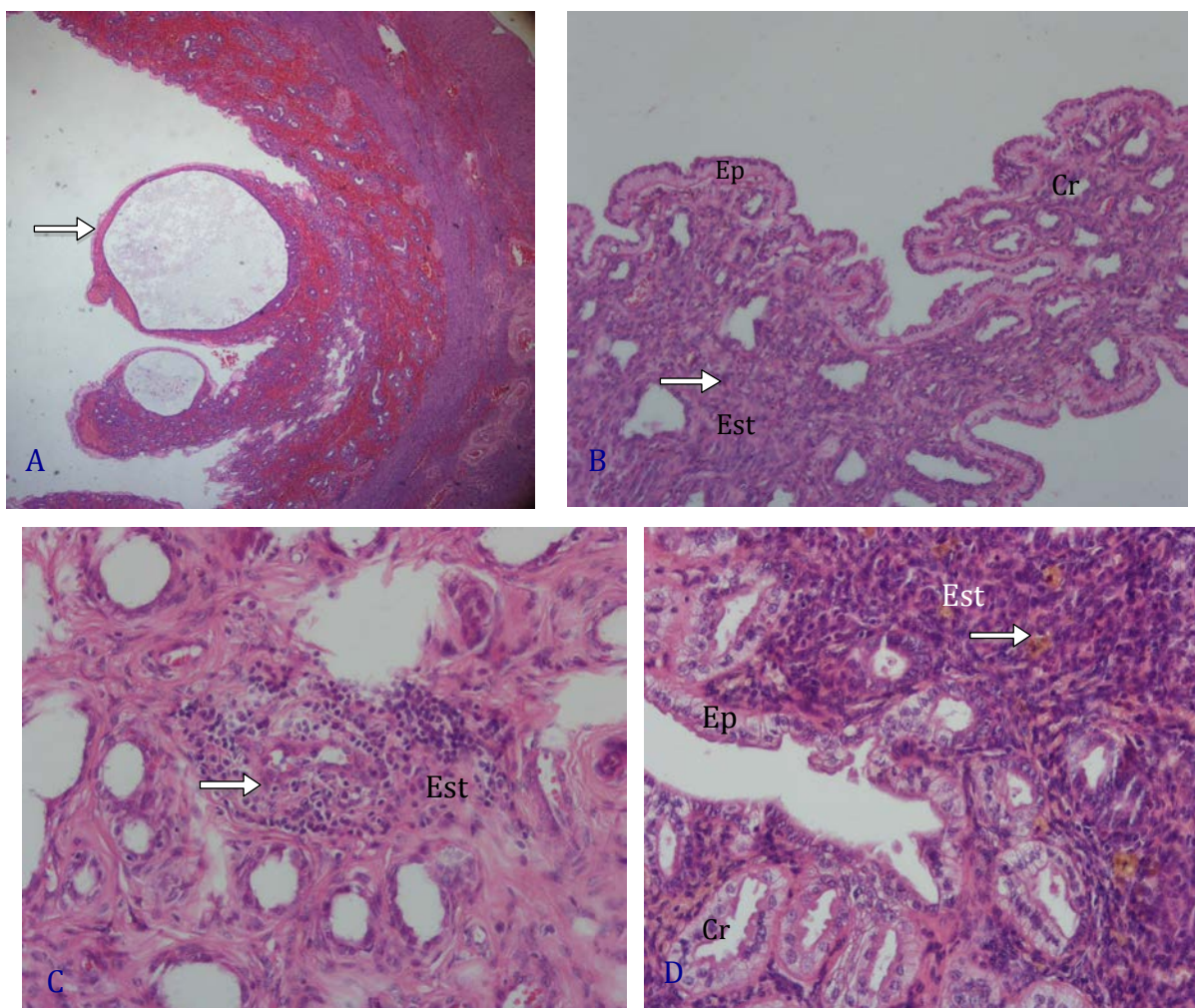
Nos úteros com HQE de estadio I observou-se a presença de glândulas quísticas ricas em mucopolissacarídeos, que desorganizam a estratificação normal do endométrio, não existindo evidência de inflamação do endométrio (Figura 15). Nos úteros com HQE de estadio II observou-se a presença de glândulas quísticas ricas em mucopolissacarídeos e por vezes o epitélio luminal apresentou-se estratificado. Neste estadio, observou-se uma infiltração inflamatória rica em plasmócitos, linfócitos e macrófagos principalmente no estroma superficial, embora por vezes também na zona das criptas (Figura 16).

Figura 15- Cortes histológicos de útero em diestro com hiperplasia quística do endométrio de estadio I - Coloração H&E



Legenda: A- glândulas basais (GB) distendidas e estroma (Est) sem células inflamatórias (100x); B- o endométrio de HQE estadio I em maior ampliação, epitélio luminal secretor (Ep), criptas (Cr) e estroma (Est) (400x) (coloração H&E).

Figura 16- Cortes histológicos de útero em diestro com hiperplasia quística do endométrio de estadio II - Coloração H&E

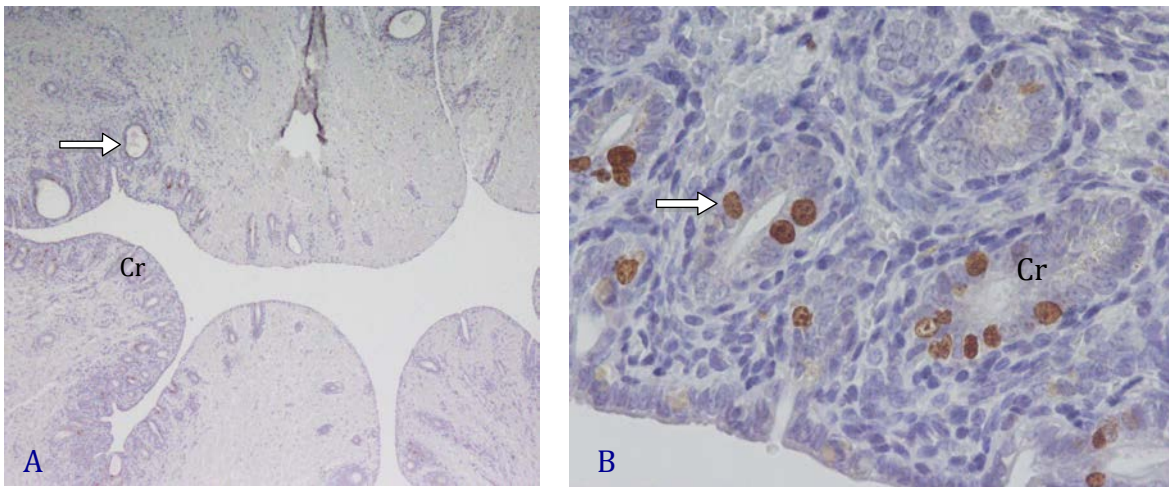


Legenda: A- glândulas quísticas fazendo protrusão para o lúmen uterino (seta) (40x); B- epitélio luminal secretor (Ep), criptas (Cr) e estroma (Est) com infiltração de células inflamatórias (seta) (100x), C- estroma (Est) com agregado de células inflamatórias (seta) (400x); D- Epitélio luminal secretor (Ep), criptas (Cr) e estroma (Est) com infiltração de células inflamatórias (seta), coloração H&E (100x);

2. Avaliação do índice de proliferação celular por Ki67

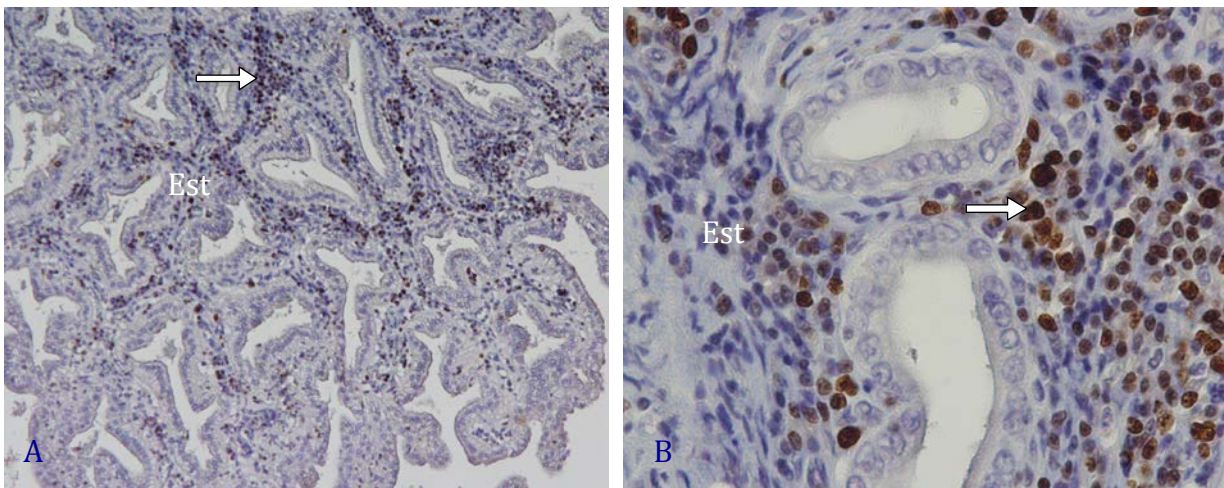
Os resultados da avaliação do índice de proliferação celular em cada compartimento celular de úteros com HQE (Figura 17 e 18) nas situações de estro persistente, fim de diestro e diestro associado a persistência de quistos foliculares estão sumarizados na tabela 7. Neste último grupo, fez-se uma divisão entre o início de diestro (D0-10), meio de diestro (D30-40) e fim de diestro. Os índices de proliferação obtidos foram posteriormente comparados com os índices de proliferação obtidos em úteros normais nas mesmas fases do ciclo éstrico, sem HQE e sem quistos ováricos (Cruz, 2011) (Tabela 7).

Figura 17- Cortes histológicos de útero com hiperplasia quística do endométrio de estadio I- Marcação com Ki67



Legenda: A- Endométrio com HQE estadio I- presença de glândulas quísticas perto do epitélio luminal (seta) (40x). Observa-se marcação de proliferação celular na criptas (Cr); B- marcação por Ki67 das criptas (Cr) em maior ampliação (seta) (400x).

Figura 18- Cortes histológicos de útero com hiperplasia quística do endométrio estadio II- Marcação com Ki67



Legenda: A- Endométrio com glândulas distendidas e estroma (Est) com infiltração de células inflamatórias, com marcação evidente por Ki67 (seta) (100x). B- maior ampliação da marcação por Ki67 das células do estroma (Est) (seta) (400x).

Tabela 7- Índices de proliferação celular de úteros normais e úteros com HQE, nos diferentes tipos celulares do endométrio, nas fases de estro, início, meio e fim de diestro (média e desvio padrão).

	Epitélio	Criptas	G. Basais	Estroma	Vasos
Estro					
Útero sem HQE*	20,68 (20,35)	13,35 (14,69)	6,28 (10,87)	8,55 (9,24)	9,30 (12,73)
Útero com HQE	8,56 (6,04)	9,42 (10,67)	6,68 (7,63)	2,33 (1,92)	1,09 (1,15)
Início de Diestro					
Útero sem HQE*	0,00 (0,00)	0,00^a (0,00)	80,28^a (17,98)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Útero com HQE+ quisto folicular	0,20 (0,29)	0,70^b (0,26)	15,73^b (11,73)	0,60 (0,59)	0,68 (0,48)
Meio de Diestro					
Útero sem HQE*	3,60 (2,65)	0,63 (0,90)	0,00 (0,00)	0,00^a (0,00)	0,00 (0,00)
Útero com HQE + quisto folicular	1,6 (2,25)	0,45 (0,37)	1,14 (2,24)	0,68^b (0,43)	0,00 (0,00)
Fim de Diestro					
Útero sem HQE*	11,08^a (5,79)	7,28 (5,55)	0,00^a (0,00)	0,00^a (0,00)	0,00 (0,00)
Útero com HQE	1,88^b (2,06)	1,43 (1,90)	1,63^b (1,06)	2,75^b (4,36)	0,61 (1,06)
Útero com HQE + quisto folicular	1,12^b (1,28)	4,28 (4,03)	1,21^b (0,84)	1,29^b (0,65)	0,21 (0,36)

Legenda- Epitélio- epitélio luminal; G. Basais- glândulas basais. Útero HQE- útero com hiperplasia quística do endométrio. *-refere-se a úteros usados no estudo de Cruz (2011). Os valores apresentados referem-se às médias e desvio padrão do índice de proliferação celular. Os valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas para a mesma fase do ciclo éstrico ($p < 0,05$) no teste *Mann-Whitney U*.

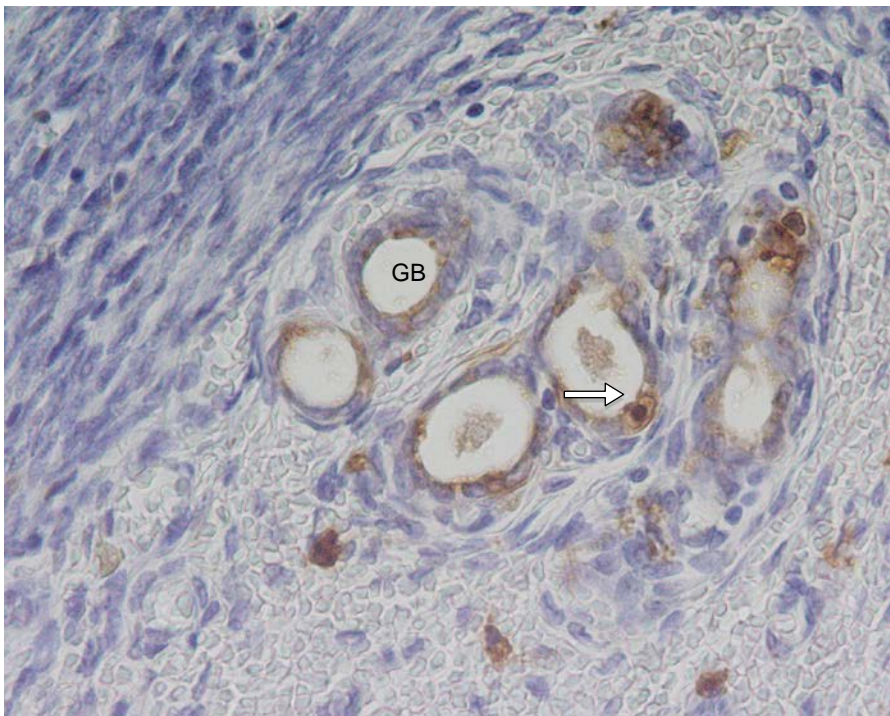
No início de diestro, os úteros com HQE associada à persistência de quistos ováricos, apresentaram maiores índices de proliferação no epitélio das criptas e menores índices de proliferação no epitélio das glândulas basais do que os úteros sem HQE e sem quistos ováricos. No meio de diestro, os úteros com HQE associada à persistência de quistos ováricos, apresentaram maiores índices de proliferação nas células do estroma do que os úteros sem HQE e sem quistos ováricos. Na fase final de diestro, os úteros com HQE (associada ou não a quistos ováricos) apresentaram, em média, menores índices de

proliferação celular no epitélio luminal e maiores índices de proliferação celular no epitélio das glândulas basais e nas células do estroma quando comparados com úteros sem HQE. Foram ainda comparados os índices de proliferação celular, nos diferentes compartimentos celulares, entre os úteros em fim de Diestro com HQE no estadio I e no estadio II, observando-se maiores índices de proliferação nas células epiteliais das criptas nos úteros com HQE de estadio II ($p=0,028$). Comparou-se igualmente, para cada estadio de HQE, os úteros em fim de diestro associado a quistos foliculares e sem quistos foliculares, observando-se que no primeiro caso, os úteros com HQE de estadio I apresentaram um aumento significativo ($p=0,046$) do índice de proliferação nas células epiteliais das criptas.

3. Avaliação do índice de apoptose celular por TUNEL

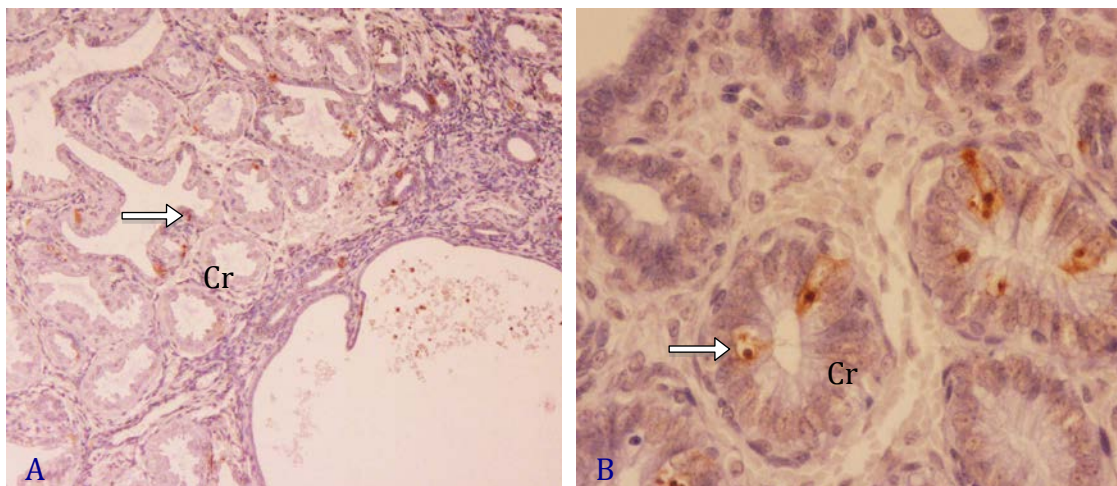
Os resultados da avaliação do índice de apoptose em cada compartimento celular de úteros com HQE (Figura 19 e 20) nas situações de estro persistente, fim de diestro e diestro associado a persistência de quistos foliculares estão sumarizados na tabela 8. Neste último grupo, fez-se uma divisão entre o início de diestro (D0-10), meio de diestro (D30-40) e fim de diestro. Os índices de apoptose obtidos foram posteriormente comparados com os índices de apoptose obtidos em úteros normais nas mesmas fases do ciclo éstrico, sem HQE e sem quistos ováricos (Cruz, 2011) (Tabela 8).

Figura 19- Corte histológico de útero com hiperplasia quística do endométrio estadio I- Marcação com TUNEL



Legenda: A- Endométrio com marcação por TUNEL- observa-se marcação positiva nas glândulas basais(GB). A seta mostra um núcleo picnótico (40x).

Figura 20- Cortes histológicos de útero com hiperplasia quística do endométrio de estadio II- Marcação por TUNEL



Legenda: A-Endométrio com glândulas muito distendidas (Cr), com marcação por TUNEL evidente (setas)(40x). Note-se na figura B, a marcação do epitélio das criptas (Cr) (seta) em maior ampliação, evidenciando os núcleos picnóticos (400x).

Como se observa na tabela 8, na fase de estro, os úteros com HQE associada à persistência de quistos ováricos, apresentaram, em média, maiores índices de apoptose no epitélio das glândulas basais quando comparados com úteros sem HQE e sem quistos ováricos. No fim de diestro, os úteros com HQE associada à persistência de quistos ováricos, apresentaram menores índices de apoptose no epitélio luminal quando comparados com úteros sem HQE e sem quistos foliculares. Nesta mesma fase, os úteros com HQE não associada a quistos ováricos, apresentaram maiores índices de apoptose no epitélio das glândulas basais do que os úteros sem HQE e sem quistos ováricos (tabela 8).

Foram ainda comparados os índices de apoptose entre os úteros em fim de Diestro com HQE no estadio I e no estadio II, observando-se no estadio II um aumento significativo nos índices de apoptose nas células do epitélio luminal ($p=0,028$) e das criptas ($p=0,027$). Não existiram diferenças significativas para cada estadio de HQE entre úteros com HQE com ou sem quistos ováricos, em fim de diestro (tabela 8).

Tabela 8 - Índices de apoptose de úteros normais e úteros com HQE, nos diferentes tipos celulares do endométrio, nas fases de estro, início, meio e fim de diestro (média e desvio padrão).

	Epitélio	Criptas	G. Basais	Estroma	Vasos
Estro					
Útero sem HQE	0,45 (0,30)	0,34 (0,36)	0,30^a (0,28)	0,09 (0,12)	0,00 (0,00)
Útero com HQE	0,21 (0,14)	0,50 (0,31)	0,74^b (0,20)	0,35 (0,25)	0,03 (0,04)
Início de Diestro					
Útero sem HQE	0,15 (0,09)	0,26 (0,10)	0,59 (0,26)	0,17 (0,12)	0,00 (0,00)
Útero com HQE + quisto folicular	0,83 (0,73)	1,42 (1,65)	0,99 (0,32)	0,31 (0,16)	0,00 (0,00)
Meio de Diestro					
Útero sem HQE	0,25 (0,35)	0,63 (0,24)	2,62 (1,01)	0,11 (0,14)	0,08 (0,14)
Útero com HQE + quisto folicular	0,48 (0,34)	0,87 (0,38)	3,26 (0,61)	0,48 (0,37)	0,25 (0,26)
Fim de Diestro					
Útero sem HQE	0,71^a (0,13)	0,79 (0,18)	1,24^a (0,22)	0,72 (0,27)	0,28 (0,31)
Útero com HQE	0,56 (0,32)	0,80 (0,42)	1,97^b (0,71)	0,78 (0,32)	0,09 (0,12)
Útero com HQE+ quisto folicular	0,24^b (0,15)	0,74 (0,08)	1,80 (0,71)	0,74 (0,18)	0,03 (0,04)

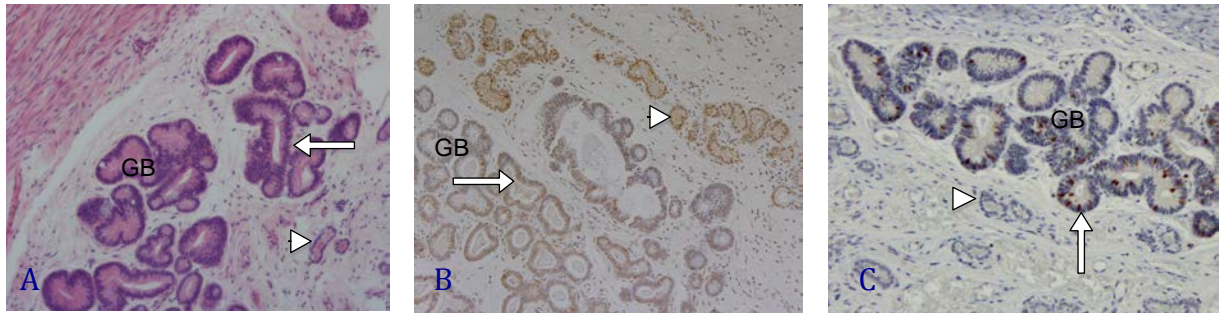
Legenda- Epitélio- epitélio luminal; G. Basais- glândulas basais. Útero HQE- útero com hiperplasia quística do endométrio. *-refere-se a úteros usados no estudo de Cruz (2011). Os valores apresentados referem-se às médias e desvio padrão do índice de apoptose. Os valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas nessa fase do ciclo éstrico ($p < 0,05$) no teste *Mann-Whitney U*.

4. “Ilhas glandulares”

Nos úteros com HQE de meio de diestro, observaram-se agrupamentos de glândulas basais, que denominamos de “ilhas glandulares”, com baixo índice de apoptose e que possuíam características morfológicas de glândulas no início de diestro. Estes agrupamentos para além da menor marcação com o método de TUNEL, eram moderadamente positivos ao Ki-67 e por isso encontravam-se numa fase de proliferação celular (figura 21), numa altura em

as glândulas basais apresentam normalmente elevado índice apoptótico e ausência de sinais de proliferação celular.

Figura 21- Cortes histológicos de útero de cadela no meio de diestro com "ilhas glandulares" - Coloração H&E, marcação com TUNEL e Ki67



Legenda: Glândulas basais (GB) hipertrofiadas agrupadas (seta), em simultâneo com glândulas basais em involução (cabeça de seta), coloração H&E (A), TUNEL (B), Ki67 (C) (100x).

5. Progesterona

Dentro da mesma fase do ciclo éstrico, a concentração de progesterona sérica não foi diferente entre grupos.

6. Zaragatoas intra-uterinas

Em nenhum caso foi observado crescimento bacteriano a partir das zaragatoas intra-uterinas colhidas após OVH.

V. DISCUSSÃO

Na cadela, a HQE é a alteração do útero com maior prevalência, não estando na maioria dos casos associada a sinais clínicos. Este facto ficou patente no nosso estudo, uma vez que a maioria dos úteros foram recolhidos de cadelas que não apresentavam sinais clínicos e que foram submetidas electivamente a OVH por motivos de contracepção. É uma alteração que ocorre, normalmente, após vários ciclos éstricos (Dow, 1958; Niskanen e Thrusfield, 1998), o que está de acordo com a média de idades encontrada na amostragem deste estudo (7,7 anos). A maior prevalência da doença obtida em cadelas de raça indeterminada, contrariamente ao descrito por Niskanen e Thrusfield (1998), relaciona-se provavelmente com a distribuição de raças que ocorre em Portugal.

Na caracterização histológica da amostragem observou-se uma maior prevalência de HQE de estadio I, facto possivelmente relacionado com a realização das OVH electivamente, encontrando a afecção numa fase precoce, em cadelas sem sintomatologia.

O fim de diestro e grande parte do anestro é caracterizado pelo fim do processo de involução ao nível das glândulas basais e criptas, por um aumento de apoptose das células do estroma, e pela degenerescência e posterior proliferação do epitélio luminal (Chu et al., 2002b; Cruz, 2011). Estas alterações permitem que, no próximo ciclo éstrico, o útero esteja nas melhores condições para que ocorra uma possível gestação. No nosso estudo, os úteros com HQE (associada ou não à presença de quistos foliculares) apresentaram, no final de diestro, menores índices de proliferação celular e de apoptose ao nível do epitélio luminal do que úteros sem HQE. A regeneração incompleta do epitélio luminal pode ser responsável por falhas na implantação do embrião, o que leva a situações de infertilidade que é uma característica desta afecção.

Por outro lado, o aumento do índice de proliferação no epitélio das glândulas basais observado nos úteros com HQE, numa altura em que estas deveriam estar a sofrer involução, justifica o aumento do número e da dimensão destas glândulas, ficando muitas delas com morfologia quística. O aumento do índice apoptótico observado nestas mesmas glândulas poderá estar associado a uma tentativa de compensar o aumento do número de células.

O facto do índice apoptótico ter sido maior no útero com HQE que no útero normal ao nível do epitélio das glândulas basais, tanto na fase de estro como na fase final do diestro, poderá estar relacionado com um mecanismo de compensação do aumento da proliferação nestas estruturas celulares.

A causa do aumento da proliferação nos diferentes compartimentos celulares ainda não é conhecido, mas poderá estar associado a alterações na expressão dos RP ou RE que poderão levar a alterações nas relações entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Uma maior expressão dos RP e RE ao nível do epitélio das glândulas basais, no final do diestro, foi descrito por De Cock e colaboradores (1997b) e Vermeirsch e colaboradores

(1999). A nível uterino, isto resulta num prolongamento da acção da progesterona e numa maior sensibilidade das células a concentrações baixas de estrogénio, resultando nas alterações proliferativas típicas desta afecção.

Neste estudo, as concentrações plasmáticas de progesterona, não foram diferentes entre cadelas com úteros sem e com HQE, dentro da mesma fase do ciclo éstrico, o que está de acordo com estudos anteriores (Hardy & Osborne, 1974; De Cock et al. 1997a, 2002; Johnston et al., 2001). Este facto vem reforçar a importância do número de RP e de RE activos no útero.

Em mulheres com endometriose, vários estudos demonstraram uma diminuição do índice de apoptose nas células endometriais ectópicas (Shawki et al., 2002; Beliard et al., 2004). Este fenómeno parece estar relacionado com uma diminuição da susceptibilidade das células ectópicas à apoptose, não havendo indícios de um aumento da proliferação celular. As células endometriais ectópicas apresentam um aumento da expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) (Shawki et al., 2002; Beliard et al., 2004) e uma diminuição de marcação por TUNEL e da expressão de p53 (Beliard et al., 2004) e de Bax (proteína pró-apoptótica) (Shawki et al., 2002).

O aumento do índice de proliferação nas células do estroma nos úteros com HQE deveu-se a uma maior infiltração de células de reacção inflamatória, principalmente da linha linfoplasmocitária, que foi notória nos casos de HQE de estadio II.

A reacção inflamatória associada induz a produção de factores de crescimento pelas células endometriais e células inflamatórias (De Cock et al., 2002). Durante o diestro, sob a acção da progesterona, há estimulação de GH ao nível do endométrio, o que por sua vez vai estimular a produção de IGF-1 (De Cock et al., 2002). Este aumento na produção de IGF-1 vai estimular a proliferação nas células que apresentam maior expressão dos RE, ao potencializar o efeito proliferativo dos estrogénios. Nas cadelas com HQE, De Cook e colaboradores (2002) demonstrou que as concentrações de IGF-I se encontravam particularmente elevadas nas células do epitélio luminal, do epitélio das glândulas basais e nas células estroma. O IGF-1 pode funcionar como inibidor da morte celular programada em vários tecidos (Mol et al., 1997) e estimulador da proliferação do endométrio (De Cock et al., 2002). A produção de IGF-1 pelas células de reacção inflamatória, que se localizam essencialmente no estroma superficial e ao redor das criptas, poderá justificar em parte o aumento da proliferação celular nestas últimas nos úteros em fim de diestro com HQE de estadio II em relação aos de HQE de estadio I.

Da mesma forma, a produção de TGF α pelas células inflamatórias e a localização diferencial de EGF (Kida et al., 2010), podem estar envolvidas no crescimento aberrante das

glândulas do endométrio. As alterações morfológicas nas glândulas uterinas induzidas por TGF α podem resultar na perda de expressão de EGF ao nível das células epiteliais e consequentemente na incapacidade de travar o crescimento das glândulas uterinas, ou numa regressão anormal dessas glândulas. No útero da mulher, sabe-se que o EGF potencia a susceptibilidade apoptótica do epitélio luminal e glandular do endométrio do meio até ao fim da fase secretora (Giudice et al., 1994, citado por De Cock et al., 2002). Na cadela, o mecanismo responsável pela diminuição da expressão de EGF no úteros com piómetra não é conhecido (Kida et al., 2010).

Outro factor de crescimento, o TNF, também é apontado como potencial colaborador no processo. No estudo de Santos e colaboradores (2012), a expressão do TNF foi mais evidente nas fases iniciais de HQE, o que poderá indicar o seu envolvimento na patogenia desta afecção.

Outra possibilidade para estas alterações nos factores de crescimento poderá estar relacionada com o facto de que a contaminação bacteriana resultar no aumento da expressão de TGF α pelas células inflamatórias e talvez no aumento da expressão de EGF nas células do estroma, ao contrário do que acontece no epitélio glandular e epitélio luminal, ajudando assim ao desenvolvimento de HQE (Kida, 2010). Estudos anteriores sugeriam igualmente uma estimulação do endométrio pelas bactérias que contaminam o útero durante o proestro e estro (Arora et al., 2006, Chen et al., 2006, Noakes et al., 2001) como um dos factores na génese de HQE. No entanto, nenhum crescimento bacteriano resultou da propagação das zaragatoas intra-uterinas colhidas após OVH. A ausência de contaminação uterina foi também observada nos trabalhos de Dhaliwal e colaboradores (1998), Bigliari e colaboradores (2004) e Mir e colaboradores (2013).

A persistência de estruturas do tipo folicular durante a fase de diestro, é responsável pela produção conjunta de progesterona (pelos corpos lúteos) e de estrogénio (pelas estruturas tipo folicular). Deste modo, a continuada acção dos estrogénios no útero promove um aumento do número e da expressão dos receptores de progesterona nas células potencializando a acção desta (De Cock et al., 1997b; Dhaliwal et al., 1999b). Por outro lado, a acção continuada dos estrogénios vai-se reflectir na proliferação celular ao nível glandular, numa fase em que as glândulas deveriam estar em involução. No nosso trabalho, metade dos úteros em diestro associados a persistência de quistos ováricos evidenciaram grupos de glândulas basais morfológicamente diferentes das restantes glândulas do endométrio. Este achado tinha já sido descrito por Cruz (2011), embora não tenha sido associado à presença de quistos foliculares. O epitélio das glândulas pertencentes a estas “ilhas glandulares” apresenta moderada positividade para o Ki67, sendo negativo para a marcação pelo TUNEL. Este facto indica que estas estruturas são resistentes à apoptose, uma vez que as glândulas

circundantes apresentam sinais de apoptose e estão em involução morfológica e funcional, como seria de esperar depois dos primeiros 10 dias de diestro.

Como já sugerido por Cruz (2011) estas “ilhas glandulares” poderão ser o início do aparecimento das alterações que caracterizam a HQE. A avaliação da expressão dos RE e RP, bem como da expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas nestas estruturas poderão elucidar sobre o seu aparecimento.

Quando se comparou os índices de proliferação celular endometrial, no início da fase de diestro, associada ou não à presença de quistos ováricos, verificou-se que no segundo caso houve um aumento significativo na proliferação celular ao nível das células das criptas e também nas células do estroma nos úteros de meio de diestro. A proliferação das células das glândulas basais foi, no entanto, significativamente inferior à dos úteros não associados a quistos foliculares. A associação da presença de quistos foliculares e HQE foi também sugerida por Fayer-Hoskens e colaboradores (1992) e mais recentemente por Mir e colaboradores (2013). Os estrogénios poderão ter uma acção na proliferação celular e na angiogénese, nesta fase do ciclo éstrico. O aumento da apoptose nas células do estroma, na fase média do diestro, deveria actuar como um mecanismo compensatório do aumento de proliferação observado inicialmente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos índices de apoptose, tanto nas células do estroma, como nas outras linhas celulares, no início e meio do diestro.

Verificou-se apenas esta hipótese quando foram comparados os índices de apoptose e proliferação celular no fim de diestro sem associação a quistos foliculares, entre úteros com HQE de estadio I e HQE de II. Foram observadas diferenças na proliferação das células das criptas, com maior expressão no estadio II, coexistindo com aumentos significativos de apoptose nestas células e nas células do epitélio luminal.

No início de diestro (D0-10), as glândulas basais apresentam um elevado índice de proliferação celular (Cruz, 2011), o que sugere uma acção reguladora da progesterona durante esta fase (Van Cruchten et al., 2004).

Embora não significativo, devido ao pequeno número da amostra, as concentrações de progesterona associada a úteros de início de diestro e quistos foliculares, foram inferiores às concentrações observadas para o início de diestro não associado a quistos foliculares. Este facto poderá estar relacionado com uma acção negativa do estradiol produzido pelo quisto folicular, na produção de progesterona pelo corpo lúteo. Deste modo, uma diminuição nas concentrações de progesterona no início de diestro, poderia justificar o menor índice de proliferação no epitélio das glândulas basais nas situações de quistos foliculares.

Na porca, na ausência de uma exposição do endométrio a concentrações adequadas de progesterona ao longo da primeira metade do diestro, os efeitos proliferativos do estrogénio não são contrabalançados adequadamente pela progesterona (Dutta et al., 1990, citado por De Bosschere et al., 2002a). Na cadela, apenas existe registo de um estudo que indica esta possibilidade (De Bosschere et al., 2002a).

O aumento da expressão dos RP na HQE poderá levar a um aumento da susceptibilidade dos tecidos a concentrações sistémicas semelhantes de progesterona (Dhaliwal et al. 1999; De Bosschere et al., 2002a). Os estudos de De Bosschere e colaboradores (2002a) também demonstraram que os receptores de progesterona e estrogénio, especialmente no epitélio glândular e nas células do estroma, escapam ao *feed-back* negativo da acção da progesterona no decurso de um tratamento prolongado com progestagénios. Deste modo, o facto de a cadela ter um diestro de duração prolongada (2 meses) cada 6 meses, poderá a longo prazo ter um efeito semelhante. Este efeito agrava-se quando o intervalo entreaios é de 4 meses.

Nos canídeos foi demonstrado que a GH produzida na glândula mamária atinge a circulação sistémica e é biologicamente activa (Bhatti et al., 2007). O aumento da produção de GH pela glândula mamária associado à estimulação da expressão dos receptores para a GH nas células epiteliais endometriais pode explicar a presença de GH nas nestas células (Kooistra et al., 1997). Interessantemente, nas cadelas intervencionadas no serviço de cirurgia do Hospital Escolar da FMV, sujeitas simultaneamente a mastectomia e OVH, tem-se verificado a coexistência, na maioria das vezes, de neoplasias mamárias e de úteros com hiperplasia quística do endométrio de diferentes estadios, inclusive casos de piómetra. No entanto, é de salvaguardar que as cadelas intervencionadas são geralmente de idades mais avançadas e portanto, como já foi dito, a probabilidade de os úteros apresentarem HQE também é superior. A presença de alterações na glândula mamária pode induzir um excesso de produção de GH, que vai regular a concentração plasmática de IGF-1. O aumento da expressão dos RE no epitélio glandular e células do estroma em úteros com HQE, poderá sugerir uma cooperação da IGF-1 com os estrogénios na indução da proliferação do endométrio, como já foi referido.

Um estudo recente de Wilborn e Maxwell (2012) refere que o tratamento de quistos foliculares, destinado a induzir a ovulação ou luteinização dos quistos, consegue-se com recurso a hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) ou gonadotrofina coriónica humana (hCG), ou por drenagem dos quistos por laparoscopia ou mesmo remoção cirúrgica dos quistos e/ou ovário, caso não sejam bilaterais. No caso de estar correcta a ideia de que existe uma associação entre a presença de quistos ováricos e presença de “ilhas

glandulares” e de que esta última possa estar na génese da HQE, o tratamento precoce dos quistos ováricos poderia ser benéfico para evitar o desenvolvimento da HQE.

Na cadela, o uso de progestagénios que é preconizado no tratamento da hiperplasia uterina benigna na mulher, está totalmente contra-indicado no tratamento da hiperplasia quística do endométrio (Dow, 1958, Niskanen & Thrusfield, 1998; Dhaliwal et al., 1999; De Bosschere et al., 2002c).

VI. CONCLUSÃO

Na vida reprodutiva de uma cadela, as características inerentes ao ciclo éstrico tornam-na mais susceptível a alterações multifactoriais que levam a uma incidência elevada de hiperplasia quística do endométrio em cadelas de meia-idade a idade avançada. Entre outros factores de risco, a presença de quistos foliculares na fase de diestro, poderá potencializar o aparecimento precoce das alterações observadas na HQE.

No estudo realizado verificamos que existem diferenças significativas de proliferação e apoptose em algumas linhas celulares entre úteros normais e úteros com hiperplasia quística, em determinadas fases do ciclo. Observaram-se igualmente diferenças entre úteros normais e úteros sem hiperplasia quística mas com quistos ováricos, nomeadamente o aparecimento de “ilhas glandulares” que hipoteticamente poderão participar na génese da doença em estudo.

O presente estudo mostrou assim que alterações nos padrões normais de proliferação e de apoptose celular no endométrio da cadela poderão estar envolvidos na patogenia da hiperplasia quística do endométrio.

O estudo das vias envolvidas na regulação da apoptose durante o ciclo éstrico, através da avaliação da expressão dos factores pró-apoptóticos (Fas, FasL e Bax) e anti-apoptóticos (Bcl-2) a nível do endométrio, assim como a expressão de receptores hormonais e de factores de crescimento, poderão ajudar a perceber o balanço entre a proliferação e a apoptose neste tecido.

O desenvolvimento de protocolos com vista à diminuição da progressão da HQE ou mesmo à regressão das alterações já observadas no endométrio poderiam permitir a manutenção da fertilidade potencial da cadela durante mais tempo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Allen, R.T., Hunter, W. J. 3rd. & Agrawal, D.K. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 37, 215-228.
- Arora, N., Sandford, J., Browning, G. F., Sandy, J. R., & Wright, P. J. (2006). A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 66(6-7), 1530–1536.
- Beliard, A., Noel, A. & Foidart, J.M. (2004). Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertility and Sterility*, 82, 80-85.
- Bhatti, S. F. M., Rao, N. A. S., Okkens, A. C., Mol, J. A., Duchateau, L., Ducatelle, R., van den Ingh, T.S., Tshamala, M., Van Ham, L.M., Coryn, M., Rijnberk, A. & Kooistra, H. S. (2007). Role of progestin-induced mammary-derived growth hormone in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia in the bitch. *Domestic animal endocrinology*, 33(3), 294–312.
- Bigliardi, E., Parmigiani, E., Cavirani, S., Luppi, A., Bonati, L. & Corradi, A. (2004). Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra complex in the bitch. *Reprod Dom Anim*, 39, 136–140.
- Chandra, S.A. & Adler, R.R. (2008). Frequency of different estrous stages in purpose-bred beagles: a retrospective study. *Toxicologic Pathology*, 36, 944-949.
- Chen, Y.M.M., Lee, C.S. & Wright, P.J. (2006). The roles of progestogen and uterine irritant in the maintenance of cystic endometrial hyperplasia in the canine uterus. *Theriogenology*, 66, 1537-54.
- Chen, Y.M.M., Wright, P.J. & Lee, C.S. (2001). A model for the study of cystic endometrial hyperplasia in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 407-14.
- Chu, P.Y., Lee, C.S., Wright, P.J. (2006). Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Theriogenology*, 66 (6-7), 1545-9.
- Chu, P.Y., Wright, P.J. & Lee, C.S. (2001). Association of endometrial degeneration in bitches with insufficient plasma progestagen concentrations. *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 35-43.
- Chu, P.Y., Wright, P.J. & Lee, C.S. (2002). Apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Reprod Fertil Dev*, 14(5-6), 297-305.
- Chu, P.Y., Lee, C.S., Moore, P.F. & Wright, P.J. (2001). Oestrogen and progestagen treated ovariectomized bitches: a model for the study of uterine function. *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 45-54.
- Concannon, P.W. (1986). Canine pregnancy and parturition. *Vet Clin of North America: Small Animal Practice*, 16, 453-475.
- Concannon, P.P.W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124, 200-210.
- Corrada, Y., Arias, D., Rodríguez, R., Tortora, M. & Gobello, C. (2006). Combination dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 66, 1557-9.

- Cruz, S (2011). *Proliferação e apoptose celular no endométrio da cadela*.- Tese de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- Davidson, A, Feldman, E. (2010). Ovarian and Estrous Cycle Abnormalities In Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th Edition. (pp. 1883-1889). Saunders
- Davidson, A.P. & Stabenfeldt, G. (2002) In Cunningham, J.G. & Klein, B.G. *Textbook of Veterinary Physiology*, 3^a edição (pp. 443-469). Saunders
- De Bosschere, H., Ducatelle, R. & Tshamala, M. (2002). Is mechanically induced cystic endometrial hyperplasia (CEH) suitable model for study of spontaneously occurring CEH in the uterus of the bitch?. *Reprod Domest Anim*, 37, 152-7.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Tshamala, M. & Coryn, M. (2002). Changes in sex hormone receptoree during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*, 58, 1209-1217.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Tshamala, M. (2003). Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch. *J Comp Pathol*, 128, 99-106.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P. & Coryn, M. (2002). Estrogen-a and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Anim Reprod Sci*, 70, 251-9.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W. & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology*, 55, 1509-19.
- De Cock, H., Ducatelle, R., & Logghe, J. P. (1997a). Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. *Domestic Animal Endocrinology*, 14, 133–147.
- De Cock, H., Ducatelle, R., Tilmant, K., & De Schepper, J. (2002). Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 57(9), 2271–2287.
- De Cock, H., Vermeirsch, H., Ducatelle, R., & De Schepper, J. (1997b). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 48, 1035–1047.
- Dhaliwal, G. K., England, G. C. W., & Noakes, D. E. (2002). The effects of endometrial scarification on uterine steroid receptors, bacterial flora and histological structure in the bitch. *Animal Reproduction Science*, 69(3-4), 239–249.
- Dhaliwal, G. K., England, G. C., & Noakes, D. E. (1997). Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 51, 167–176.
- Dhaliwal, G. K., England, G. C., & Noakes, D. E. (1999a). Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. *The Veterinary Record*, 145(16), 455–457.

- Dhaliwal, G. K., England, G. C., & Noakes, D. E. (1999b). The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. *Animal Reproduction Science*, 56(3-4), 259–277.
- Dhaliwal, G. K., Wray, C., & Noakes, D. E. (1998). Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). *The Veterinary Record*, 143(24), 659–661.
- Dow, C. (1958). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record*, 70, 1102.
- Dow, C. (1959). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Journal of Comparative Pathology*, 69, 237–250.
- Fayrer-Hosken, R. A., Durham, D. H., Allen, S., Miller-Liebl, D. M. & Caudle, A. B. (1992). Follicular cystic ovaries and cystic endometrial hyperplasia in a bitch. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201(1), 107–108.
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2004). Cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex. In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd Edition. (pp. 852-67). Saunders.
- Fieni, F. (2006). Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. *Theriogenology*, 66(6-7), 1550–1556.
- Galabova, G., Egerbacher, M., Aurich, J. E., Leitner, M. & Walter, I. (2003). Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 38(5), 415–420.
- Gobello, C. (2006). Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: a review. *Theriogenology*, 66(6-7), 1560–1567.
- Grivicich, I., Regner, A. & Brondani da Rocha, A. (2007). Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53 (3), 335-343.
- Hadley, J. C. (1975). The development of systic endometrial hyperplasia in the bitch following serial uterine biopsies. *The Journal of Small Animal Practice*, 16(4), 249–257.
- Hagman R., Kindahl H., Fransson B.A., Bergström A., Holst B.S., Lagerstedt A.S. (2006). Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 α metabolite analysis. *Theriogenology* 66 (2), 198-206.
- Harada, T., Kaponis, A., Iwabe, T., Taniguchi, F., Makrydimas, G., Sofikitis, N., Paschopoulos, M., Paraskevaidis, E. & Terakawa, N. (2004). Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Human Reproduction Update*, 10(1), 29–38.
- Hardy, R.M. & Osborne, C.A. (1974). Canine Pyometra: Pathophysiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. *J Am Anim Hosp Assoc*, 10, 245-268.
- Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S. & Livingston, E. H. (2007). Screening and detection of apoptosis. *The Journal of Surgical Research*, 139(1), 143–156.

- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R. & Olson, P.S. (2001). Disorders of the canine and uterine tubes (oviducts). In *Canine and Feline Theriogenology*. 3rd Edition. Philadelphia, Pa: Saunders, 2001;206-224.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2005). *Basic Histology: Text & Atlas*. 11th Edition. McGraw-Hill.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257.
- Kida, K., Maezono, Y., Kawate, N., Inaba, T., Hatoya, S. & Tamada, H. (2010). Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. *Theriogenology*, 73(1), 36–47.
- Kiechle, F. L. & Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 326(1-2), 27–45.
- Kiechle, F.L. & Zhang, X. (1998). Apoptosis: a brief review. *J Clin Ligand Assay*, 21, 58–61.
- Kooistra, H. S. & Okkens, A. C. (2002). Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197(1-2), 167–172.
- Kooistra, H. S., Okkens, A. C., Bevers, M. M., Popp-Snijders, C., van Haaften, B., Dieleman, S. J. & Schoemaker, J. (1999). Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *Biology of Reproduction*, 60(1), 65–71.
- Kooistra, H. S., Okkens, A. C., Mol, J. A., van Garderen, E., Kirpensteijn, J. & Rijnberk, A. (1997). Lack of association of progestin-induced cystic endometrial hyperplasia with GH gene expression in the canine uterus. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 51, 355–361.
- Kumar, R., Herbert, P. E. & Warrens, A. N. (2005). An introduction to death receptors in apoptosis. *International Journal of Surgery*, 3(4), 268–277.
- Marti, A., Jaggi, R., Vallan, C., Ritter, P.M., Baltzer, A., Srinivasan, A., Dharmarajan, A.M. & Friis, R.R. (1999). “Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases”. *Cell Death and Differentiation*, 6, 1190-1200.
- Mateus, L. & Eilts, B. (2010). Cystic Endometrial Hyperplasia and Pyometra In Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th Edition.(pp. 1913-1920). Saunders
- McConkey, D. J. (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*, 99(3), 157–168.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796– 801.
- Mir, F., Fontaine, E., Albaric, O., Greer, M., Vannier, F., Schlafer, D. H. & Fontbonne, A. (2013). Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. *Theriogenology*, 79(2), 312–322.

- Mol, J. A., Selman, P. J., Sprang, E. P., van Neck, J. W. & Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A. (1997). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 51, 339–344.
- Moya Jimenez .L. & Vidal, R.S. (2004) Aparato genital feminino. In Ortiz, A.G. & Rodrigues, A.B. *Tratado de Histología Veterinária*. 1ª edição (pp. 381-392). Masson
- Niskanen, M. & Thrusfield, M. V. (1998). Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *The Veterinary Record*, 143(18), 493–498.
- Noakes, D. E., Dhaliwal, G. K. & England, G. C. (2001). Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 57, 395–406.
- Nomura, K. & Funahashi, H. (1999). Histological characteristics of canine deciduoma induced by intrauterine inoculation of *E. coli* suspension. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 61(4), 433–438.
- Nomura, K. & Nishida, A. (1998). Histological variations of canine deciduoma induced in non pregnant horn at different stages of unilateral pregnancy. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 60(5), 623–626.
- Nomura, K. (1983). Canine pyometra with cystic endometrial hyperplasia experimentally induced by *E. coli* inoculation. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 45(2), 237–240.
- Nomura, K. (1994). Induction of a deciduoma in the dog. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 56(2), 365–369.
- Nomura, K. (1996). Canine deciduoma induced by intraluminal insertion of uterine grafts. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 58(2), 151–155.
- Nomura, K. (1997). Induction of canine deciduoma in some reproductive stages with the different condition of corpora lutea. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 59(3), 185–190.
- Nomura, K. Kawasoe, K. & Shimada, Y. (1990). Histological observations of canine cystic endometrial hyperplasia induced by intrauterine scratching. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(5), 979–983.
- Okkens, A. C. & Kooistra, H. S. (2006). Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(4), 291–296.
- Onclin K, Verstegen JP (1999): Comparison of different combinations of analogues of PGF2a and dopamineagonists for the termination of pregnancy in dogs. *Veterinary Record*; 10:416.
- Otsuki, Y. (2001). Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Medical Electron Microscopy*, 34(3), 166–173.
- Payan Carreira, R. & Pires, M.A. (2005) Hiperplasia quística do endométrio em cadelas; *Rev. Port. de Ciências Veterinárias*, 100 (553-554), 5-16.

- Poppl, A.G. (2008): *Avaliação da influência do ciclo estral e da hiperplasia endometrial cística- piômetra sobre a sensibilidade á insulina e características da ligação hormônio-receptor em músculo de fêmeas caninas*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Brasil: Universidade Federal de Rio Grande do Sul.
- Potter K, Hancock DH, Gallina AM. (1980-1985): Clinical and pathologic features of endometrial hyperplasia, pyometra, and endometritis in cats: 79 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198:1427.
- Pretzer, S. D. (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology*, 70(3), 359–363.
- Rehm, S., Stanislaus, D. J. & Williams, A. M. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(3), 233–245.
- Rijnberk, A. & Mol, J. A. (1997). Progesterin-induced hypersecretion of growth hormone: an introductory review. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 51, 335–338.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M. & Venkatachalam, M.A. (1999). "Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease." *American Journal of Medicine*, 107, 489-506.
- Santos, C., Vala, H., Pires, MA. & Carreira, R. (2012). Immunohistochemical study of tumournecrosis factor in canine cystic endometrial hyperplasia. *Journal of Comparative Pathology*, 146(1), 74.
- Saraste, A. & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537.
- Schlafer, D. H. & Gifford, A. T. (2008). Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology*, 70(3), 349–358.
- Shawki O. & Bahnasi A. (2002). Apoptosis and angiogenesis in endometriosis: relationship to development and progression. *Fertility and Sterility*, 77, Supplement 1, 44 –44.
- Silva, E., Leitão, S., Ferreira-Dias, G., Lopes da Costa, L. & Mateus, L. (2009). Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 Suppl 2, 200–203.
- Silva, E., Leitão, S., Henriques, S., Kowalewski, M. P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G., da Costa, L. L. & Mateus, L. (2010). Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *Journal of reproductive immunology*, 84(1), 66–74.
- Stone, E.A. (2003) Ovary and uterus. Reproductive System, Chapter 98. In Slatter. Textbook of Small Animal Surgery. 3a Edição. (pp.1487-1502)
- Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Tamada, H., Sawada, T., Ikehara, S. & Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), 619–627.

- Tsumagari, S., Ishinazaka, T., Kamata, H., Ohba, S., Tanaka, S., Ishii, M. & Memon, M. A. (2005). Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. *Animal Reproduction Science*, 87(3-4), 301–308.
- Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31(4), 214–223.
- Van Cruchten, S., Van den Broeck, W., D'haeseleer, M. & Simoens, P. (2004). Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*, 62(3-4), 631–641.
- Van Cruchten, S., Van den Broeck, W., Duchateau, L. & Simoens, P. (2003). Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*, 60(9), 1595–1608.
- Vereide, A. B., Kaino, T., Sager, G. & Ørbo, A. (2005). Bcl-2, BAX, and apoptosis in endometrial hyperplasia after high dose gestagen therapy: a comparison of responses in patients treated with intrauterine levonorgestrel and systemic medroxyprogesterone. *Gynecologic oncology*, 97(3), 740–750.
- Vermeirsch, H., Simoens, P., Hellemans, A., Coryn, M. & Lauwers, H. (2000). Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology*, 53(3), 773–788.
- Vermeirsch, H., Simoens, P., Lauwers, H. & Coryn, M. (1999). Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology*, 51(4), 729–743.
- Verstegen, J., Dhaliwal, G. & Verstegen-Onclin, K. (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70(3), 364–374.
- Voges, A. K. & Neuwirth, L. (1996). Ultrasound diagnosis—cystic uterine hyperplasia. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37(2), 131–132.
- Watts, J. R. & Wright, P. J. (1995). Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. *The Journal of Small Animal Practice*, 36(5), 201–206.
- Wheaton, L.G., Johnson, A.L., Parker, A.J. & Kneller, S.K. (1989). Results and complications of surgical treatment of pyometra: a review of 80 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 25, 563–8.
- Wilborn, R. R. & Maxwell, H. S. (2012). Clinical approaches to infertility in the bitch. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 42(3), 457–468.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251–306.